

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 472 943**

51 Int. Cl.:

C12M 3/00 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2010** **E 10794976 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.03.2014** **EP 2513288**

54 Título: **Un dispositivo de cultivo continuo**

30 Prioridad:

16.12.2009 EP 09179465

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

03.07.2014

73 Titular/es:

VIVABIOCELL SPA (100.0%)

Via del Cottonificio 127

33100 Udine, IT

72 Inventor/es:

BERRY, ERIC y

CURCIO, FRANCESCO

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 472 943 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Un dispositivo de cultivo continuo

5 La invención presente se refiere a un dispositivo para cultivar células de mamíferos en una estructura tridimensional para el trasplante o la implantación in vivo. Más particularmente, la invención presente se refiere a un dispositivo de cultivo continuo para cultivar células de hueso para implantes dentales o para la reconstrucción de huesos.

10 Existe un interés creciente por conseguir que crezcan células en entornos tridimensionales (3D) tales como en una estructura o en una retícula 3D. El cultivo de células en retículas 3D es útil en la ingeniería de los tejidos para la generación de estructuras de tejidos implantables. Dificultades intrínsecas de los cultivos 3D en retículas 3D son (i) el sembrado uniforme y eficiente de células por todos los poros de la retícula, y (ii) la transferencia de masa limitada a las células en la parte central de la retícula.

En las pasadas tres décadas se han realizado grandes avances en el campo de la ingeniería de tejidos pero aún persiste el problema asociado a la dificultad de cultivar células en el centro de estructuras profundas o gruesas.

La patente de los EE.UU. 6.194.210 describe un proceso para el virus de la hepatitis A en un cultivo de célula microportadora agregada.

15 La patente de los EE.UU. 6.218.182 describe un método para cultivar tejidos 3D, en particular tejido de hígado para usarlo como un dispositivo extracorpóreo de asistencia al hígado, en un biorreactor en donde las células son sembradas y provistas de dos flujos de medio, conteniendo cada uno de ellos un lado diferente de las células.

20 El documento WO2005/066747 describe un biorreactor que comprende una mitad de entrada y una mitad de salida, en donde dichas mitades están unidas de tal manera que el interior hueco de dicho biorreactor forma una cámara de cultivo, y comprende además al menos una red que comprende una disposición de elementos piramidales que sobresalen desde la cara de la red. Dicha red es un soporte para una o más construcciones de células en la cámara de cultivo.

25 El documento de los EE.UU. US2005/276791 describe una retícula tridimensional que incluye al menos dos capas de polímero biodegradable que tiene una pluralidad de características estructurales sustancialmente uniformes que tiene geometrías predeterminadas en donde cada capa de polímero está fijada a las otras capas para formar relaciones espaciales predefinidas entre las características estructurales de cada capa. Las retículas son "similares a películas".

La patente de los EE.UU. US 2009/0186412 describe una retícula celular porosa y métodos para su producción.

30 Todas las referencias a la técnica anterior están enfocadas a los problemas que surgen cuando un sistema de cultivo con una alta densidad celular encuentra irregularidades en el flujo.

Los biorreactores conocidos no simulan eficientemente in vivo el mecanismo de nutrición en estructuras gruesas o cuando la densidad del cultivo es elevada.

35 La regulación del flujo, la entrega de nutrientes, gases y la retirada de residuos de los cuerpos de mamíferos es un proceso automatizado que abarca muchas funciones complejas del cuerpo. La sangre tiene un sistema complejo, que soporta la capacidad de transportar grandes cantidades de gases y nutrientes a y desde células por todo el cuerpo. El flujo está gobernado por un sistema complejo que altera automáticamente el volumen y la presión para redistribuir el flujo de sangre a zonas de alta demanda. El sistema de distribución incluye miles de ramificaciones y cada ramificación puede tener diámetros internos más pequeños hasta llegar finalmente al nivel dimensional en el que las células son alimentadas.

40 El uso de software de Mecánica de Fluidos Computacional (CFD) permite el análisis del flujo dentro de una estructura compleja y de su recipiente. Cuando se identifica una combinación adecuada de características, se pueden estudiar los parámetros del metabolismo para asegurar que tanto la velocidad de utilización de materiales como la producción de productos residuales permanecen dentro de una zona típicamente segura. Un ejemplo es calcular la densidad celular máxima y la velocidad de consumo de oxígeno, para asegurar que todas las células permanecen aeróbicas.

45 Actualmente hemos encontrado un dispositivo de cultivo continuo que resuelve el problema de cultivar células en el centro de estructuras profundas o gruesas.

50 El objetivo de la invención presente es un dispositivo de cultivo continuo que comprende (a) una retícula formada por una matriz de superficies de crecimiento interconectadas separadas a intervalos regulares y (b) unos medios de distribución de fluido en la entrada y en la salida de las zonas de crecimiento; en donde las superficies de crecimiento interconectadas están separadas a intervalos regulares iguales o mayores que 0,7 mm y más pequeñas que 3,0 mm.

La separación y definición están dispuestas para permitir un flujo direccional uniforme a través y alrededor de las superficies de crecimiento.

5 Los medios de distribución de fluido en la entrada y en la salida de las zonas de crecimiento permiten un flujo adecuado para cada superficie de crecimiento. La distribución de fluido es analizada usando la Mecánica de Fluidos Computacional y el análisis de utilización del metabolito clave para asegurar que las células no están sometidas a condiciones perjudiciales de crecimiento.

10 De preferencia, los medios de distribución distribuyen el flujo entrante de nutrientes y gases frescos en las superficies de crecimiento. La superficie transversal de los canales del dispositivo de distribución y el número de canales pueden ser ajustados para facilitar la distribución uniforme en las superficies de crecimiento, dependiendo de la forma de las superficies de crecimiento y del número total de células soportadas por las superficies de crecimiento.

15 De preferencia, el dispositivo de cultivo incluye una matriz de superficies de crecimiento interconectadas, definida por la interconexión de múltiples fibras o de estructuras tridimensionales, de una manera organizada y repetitiva, que puede incorporar cualquier número de facetas o artefactos superficiales utilizados para fomentar o mejorar la fijación y crecimiento de células.

Las estructuras tridimensionales que forman la matriz pueden ser cilíndricas, rectangulares, hexagonales o de cualquier otra forma o combinación de formas y las superficies pueden ser lisas o con textura.

En una realización práctica preferida de la invención, la retícula está formada por una matriz de superficies de crecimiento interconectadas separadas a intervalos regulares alrededor del soporte central.

20 Los espacios abiertos formados por la interconexión de las estructuras, son iguales a o mayores que 0,7 mm y menores que 3 mm, de preferencia iguales o mayores que 0,9 mm y menores que 3 mm. La separación en la realización preferida es mayor que 1,0 mm, pero puede ser alterada de acuerdo con la necesidad de resistencia física de la retícula.

25 En una realización todavía más preferida de la invención presente, las superficies de crecimiento interconectadas están separadas a intervalos regulares iguales a o mayores que 1,0 mm y menores que 2,0 mm.

30 La separación es un aspecto característico de la invención presente. La variabilidad del parámetro alrededor del margen anterior permite optimizar el flujo del medio a través de la retícula y, al mismo tiempo, impartir una solidez adecuada a la estructura 3D para todos los dispositivos según la invención independientemente de su forma y dimensión finales. Las superficies abiertas formadas por la interconexión de las superficies de crecimiento crean la estructura caracterizadora organizada del dispositivo de la invención presente que difiere de la estructura porosa del dispositivo conocido de la técnica anterior.

La forma de la retícula es de preferencia cúbica, pero puede tener cualquier otra forma, por ejemplo, cilíndrica o anatómicamente correcta.

35 De preferencia, el dispositivo de cultivo incluye un gran número de superficies de crecimiento interconectadas dispuestas uniformemente para crear grandes zonas abiertas que limitan el número máximo de células por volumen, facilitando una vascularización sencilla de las zonas de crecimiento

El dispositivo de cultivo puede ser hecho de cualquier material biocompatible.

40 Materiales biocompatibles son cualquier polímero orgánico biocompatible o mezcla de éstos, así como mezclas o combinaciones de polímeros orgánicos biocompatibles con compuestos biocompatibles orgánicos o inorgánicos que no sean polímeros.

Ejemplos específicos no limitadores de componentes de material biocompatible útil para la invención presente son policaprolactona, óxido de polietileno – tereftalato, poliamida, ácido poli-L-láctico, ácido poliglicólico, colágeno, fibronectina, hidroxipatita, etc.

45 En una realización práctica preferida, el dispositivo de cultivo comprende además un alojamiento asépticamente sellado que puede ser desmontado a la terminación del periodo de cultivo. Dicho alojamiento aséptico puede incluir una cubierta retirable sellada, medios de distribución de entrada, medios de distribución de salida opcionales y los medios de soporte necesarios requeridos para fijar y asegurar las superficies de crecimiento en el dispositivo de cultivo.

50 El alojamiento puede tener la forma de un rectángulo, cilindro o cualquier otra forma necesaria para mantener el dispositivo de cultivo y aportar características adicionales para la retirada aséptica de la retícula.

La invención presente ofrece varias ventajas respecto a dispositivos de cultivo previos porque la entrega de nutriente permite la creación y el mantenimiento de la viabilidad del tejido en un sustrato grueso (> 1 mm).

El dispositivo de cultivo 3D de la invención presente puede ser producido mediante un proceso con un paso único.

Alternativamente, se puede producir primero una capa 2D, y a continuación las capas 2D sencillas pueden ser ensambladas una sobre otra para formar el dispositivo de cultivo 3D según la invención presente.

La dimensión final del dispositivo de cultivo 3D depende del número de capas 2D ensambladas.

5 El dispositivo de cultivo de la invención presente puede ser usado eficientemente para cultivar cualquier tipo de células en un tejido 3D. De preferencia, se usa para cultivar células para implantes dentales o para la reconstrucción de huesos. En cuanto las células han crecido formando un tejido 3D, el flujo del medio puede ser detenido y el tejido puede ser usado o preservado para un uso futuro.

10 El dispositivo de cultivo de la invención presente puede ser usado eficientemente también para cultivar células directamente en el cuerpo. De hecho, el dispositivo puede ser implantado en el paciente que necesite la reconstrucción de tejidos y el cultivo es efectuado in vivo.

15 Mediante el uso del dispositivo de cultivo según la invención presente se puede hacer que crezcan células en un entorno controlado en una retícula biodegradable. Las grandes zonas abiertas formadas por la interconexión de las superficies de crecimiento les permite ser expuestas a un flujo uniforme del medio e impedir la contaminación durante el proceso de crecimiento. En particular, se impide la contaminación o el bloqueo de la superficie de crecimiento por burbujas de gas durante el proceso de crecimiento.

20 Además, con el dispositivo de cultivo de la invención, las condiciones de cultivo son vigiladas continuamente y cualquier separación de las condiciones deseadas es corregida automáticamente y avisada mediante alarma. De esta manera, se proporcionan las condiciones necesarias para mantener células en su estado indiferenciado, para minimizar la máxima densidad celular y la necrosis tóxica asociada, y para proporcionar un entorno que no tiene limitada la difusión de nutrientes y gases clave.

Además, el dispositivo de cultivo según la invención presente también produce el crecimiento de tejidos en ausencia de células, según se muestra en experimentos realizados con conejos.

Ejemplo

25 Protocolo experimental

Una retícula de dos capas (11 mm x 11 mm x 5 mm) según la invención presente, cortada en cuatro piezas de dimensiones iguales, fue usada en el experimento de crecimiento celular con ratones.

Análisis y resultados histológicos

Los cuatro dispositivos de cultivo continuo fueron implantados en ratones NOD/SCID inmunodeficientes.

30 El análisis de la reacción inflamatoria después de una semana desde la implantación no mostró signos de una reacción inflamatoria típica, esto es, hinchazón, rojez, sudoración, etc.

35 El análisis histológico del material de control HA (hidroxiapatita), o sea, un material biomédico disponible comercialmente usado como muestra estándar, no reveló flogosis (por ejemplo, infiltración linfocítica), contrariamente, mostró la integración del material cerámico poroso en los tejidos (colonización fibroblástica de los poros del material).

Se retiró policaprolactona de todas las muestras que contenían el dispositivo de cultivo continuo objeto de la invención presente y fue reemplazada por parafina. Como resultado dio una imagen negativa o vacía en las microfotografías.

40 El análisis histológico de los ejemplos P (policaprolactona), PC (policaprolactona con células), PD (policaprolactona con inmersión en fosfato tricálcico) (Figura 7), y PDC (policaprolactona con inmersión en fosfato tricálcico con células) (Figura 8) no reveló ningún proceso inflamatorio en los tejidos. A continuación, la implantación in vivo del dispositivo de cultivo continuo objeto de la invención presente, proporcionó un crecimiento celular sin involucrar un proceso de inflamación del tejido.

45 El análisis realizado con ratones demostró que el dispositivo de cultivo continuo es biocompatible y no localmente tóxico. Además, la estructura característica 3D del dispositivo de cultivo continuo produce el recrecimiento del tejido.

A continuación se ilustra con más detalle la invención presente en los dibujos siguientes que representan realizaciones específicas de la invención sin limitarla.

Descripción breve de los dibujos

La Figura 1 es una realización de la retícula.

La Figura 2 es una realización del dispositivo de distribución del flujo.

La Figura 3 es una realización de la retícula entre dos dispositivos de distribución del flujo.

La Figura 4 es un diagrama del flujo del sistema.

La Figura 5 es un análisis del flujo CSD.

5 La Figura 6 es un análisis fotográfico del flujo.

La Figura 7 es una microfotografía de la muestra PD.

La Figura 8 es una microfotografía de la muestra PDC.

La Figura 9 son fotografías de muestras HA, PD y PDC.

Descripción detallada de los dibujos

10 La Figura 1 es una realización de la retícula. La retícula (1) está formada por la interconexión de una matriz de estructuras cilíndricas (3). La retícula (1) está formada alrededor del soporte central (2).

La Figura 2 es una realización del dispositivo de distribución de fluido (5). En este dispositivo, el fluido es presentado al dispositivo (5) en un conducto común (6) que está conectado a los conductos de distribución (7). Se muestran medios de soporte (8) para ser conectados al soporte central (2) de la retícula (1).

15 La Figura 3 describe una retícula (1) dispuesta entre dos de los dispositivos de distribución (5). En esta realización el fluido es entregado al conducto común de entrada (6) y es distribuido además a los conductos de distribución (7) y luego es distribuido a través y alrededor de las estructuras abiertas (4) de la retícula (1). El fluido es recogido y presentado a continuación en los conductos comunes (7), situados en el dispositivo de salida (5B) donde es recogido y presentado al conducto común (6) del dispositivo de distribución (5B).

20 La Figura 4 es una vista esquemática del dispositivo de cultivo (10) conectado al sistema de circulación central (9). Cuando el dispositivo de cultivo (10) está conectado al sistema (9), está situado para recibir un flujo continuo de nutrientes y gases disueltos proporcionados por la bomba (12). Se crea un bucle de circulación central conectando la salida de la bomba (12) a la entrada del dispositivo de cultivo (10). La salida del dispositivo de cultivo (10) está conectada a la entrada de la bomba (12) por medio del depósito de fluido (13). Hay una variedad de sensores (11) en comunicación constante con el fluido del sistema (12). Los sensores (11) están conectados a medios de control (20) que vigilan y controlan las condiciones del sistema (12). Hay dispuestas bombas adicionales (14, 15) para suministrar una entrega medida de nutrientes frescos al sistema, y materiales de residuos procedentes del sistema.

25 La Figura 5 ilustra un ejemplo de un análisis de Mecánica de Fluidos Computacional, en donde la distribución del flujo se realiza a través de la estructura.

30 La Figura 6 es un análisis fotográfico del flujo.

La Figura 7 y la Figura 8 ilustran el crecimiento de células y la ausencia de un proceso inflamatorio para la muestra PD y la muestra PDC respectivamente. Las microfotografías tienen una magnificación de 20X y los cultivos están sobre la parte superior de las microfotografías.

35 La Figura 9 ilustra las zonas de aplicación y análisis de los ejemplos HA, PD y PDC de los experimentos de crecimiento celular hechos en ratones. El análisis externo de las muestras no revela ninguna reacción fibrótica o proceso inflamatorio.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un dispositivo de cultivo que comprende (a) una retícula formada por una matriz de superficies de crecimiento interconectadas separadas a intervalos regulares y (b) unos medios de distribución de fluido a la entrada y a la salida de las superficies de crecimiento, en donde las superficies de crecimiento interconectadas están separadas a intervalos regulares iguales o mayores que 0,7 mm y menores que 3,0 mm.
2. Un dispositivo según la reivindicación 1, en donde la retícula está formada por una matriz de superficies de crecimiento interconectadas separadas a intervalos regulares alrededor de un soporte central.
3. Un dispositivo según la reivindicación 1, en donde las superficies de crecimiento interconectadas están definidas por la interconexión de múltiples fibras o de estructuras tridimensionales.
- 10 4. Un dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde las superficies de crecimiento interconectadas están separadas a intervalos regulares iguales o mayores que 0,9 mm y menores que 3,0 mm.
- 15 5. Un dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde las superficies de crecimiento interconectadas están separadas a intervalos regulares iguales o mayores que 1,0 mm y menores que 3,0 mm.
6. Un dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde las superficies de crecimiento interconectadas están separadas a intervalos regulares iguales o mayores que 1,0 mm y menores que 2,0 mm.
- 20 7. Un dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, comprendiendo adicionalmente un alojamiento sellado que puede ser desmontado al terminar el periodo de cultivo.
8. Un dispositivo según la reivindicación 7, en donde dicho alojamiento sellado asépticamente comprende una cubierta removible sellada, medios de distribución de entrada, medios de distribución de salida opcionales, y los medios de soporte necesarios requeridos para disponer y fijar las superficies de crecimiento en el dispositivo de cultivo.
- 25 9. El uso de un dispositivo de cultivo continuo según cualquiera de las reivindicaciones precedentes para cultivar células de hueso para implantes dentales o para la reconstrucción de huesos.

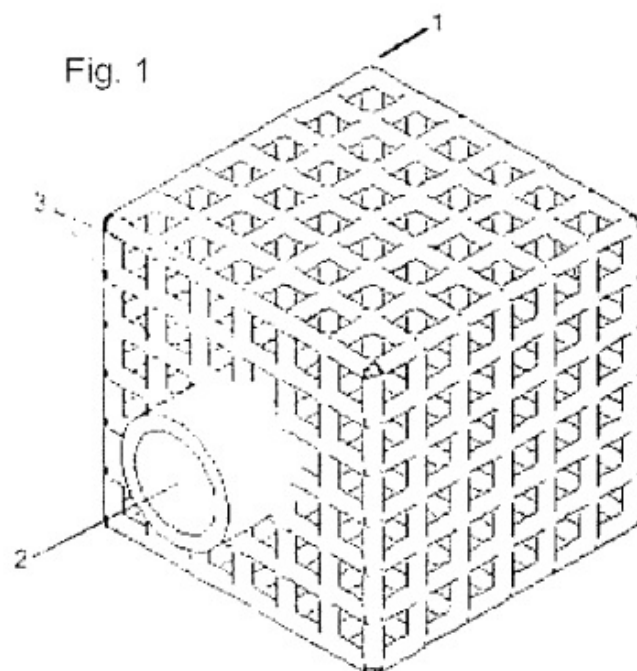


Fig. 2

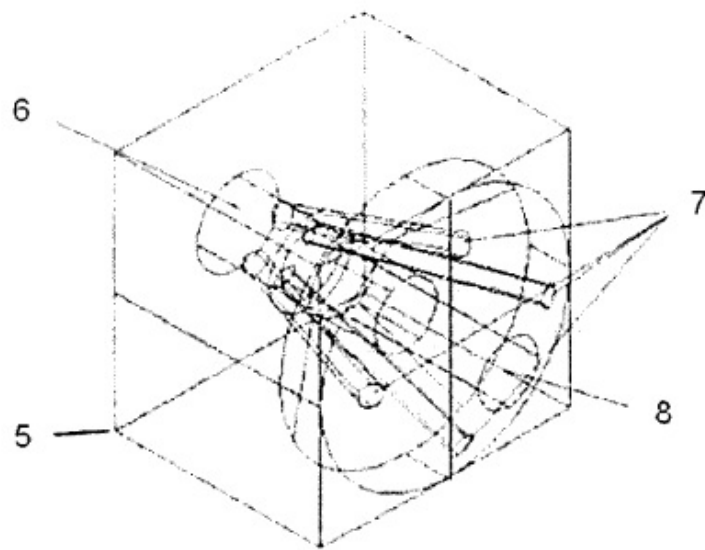
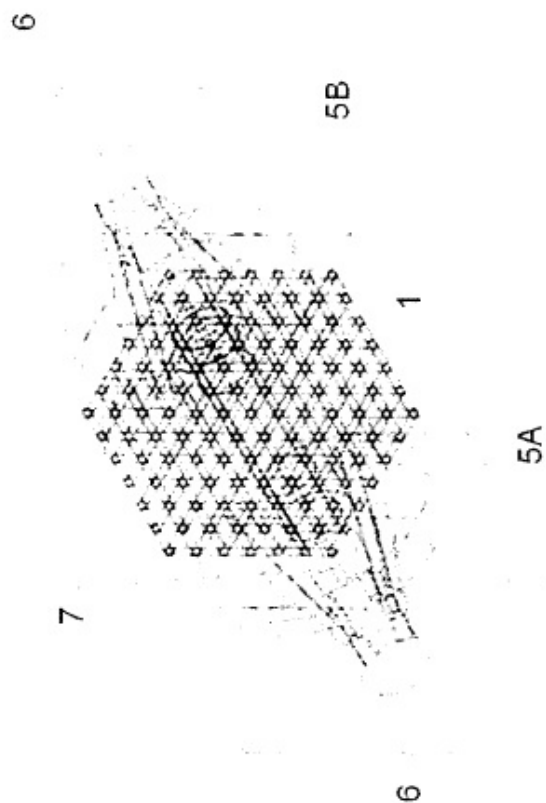
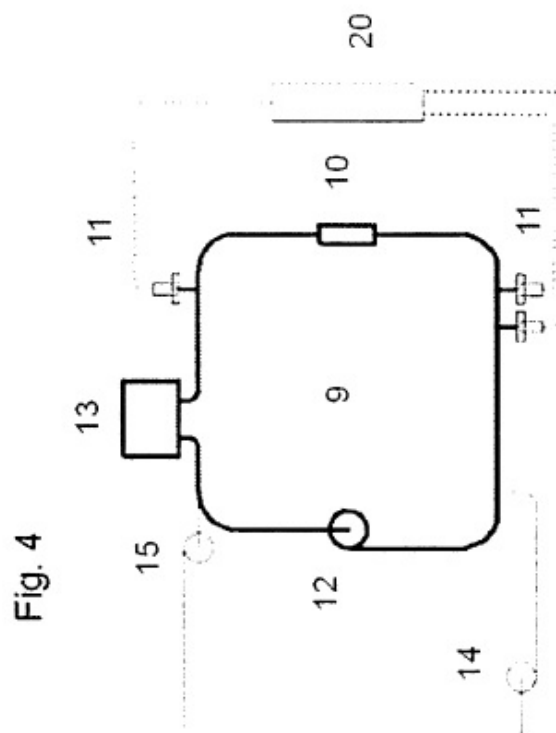


Fig. 3





$p = 8e-5 \div 0.03 \text{ Pa}$

pro-STAR 4.0
19-Feb-08
SHEAR FORCE
N
INTER=492
LOCALMX = 0.1182E-09
LOCALMN = 0.7034E-13

0.1182E-09
0.1097E-09
0.1013E-10
0.9297E-10
0.8444E-10
0.7600E-10
0.6753E-10
0.5913E-10
0.5069E-10
0.4225E-10
0.3382E-10
0.2536E-10
0.1694E-10
0.8507E-11
0.7034E-13

Y
X
Z

Fig. 5



Fig. 6

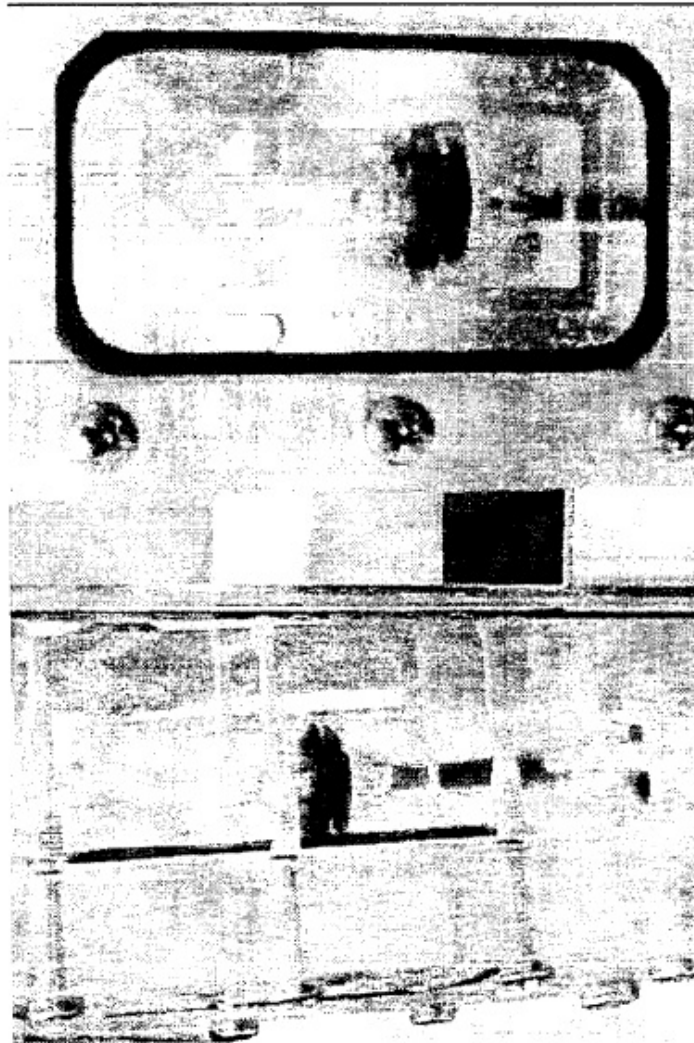


Fig. 7

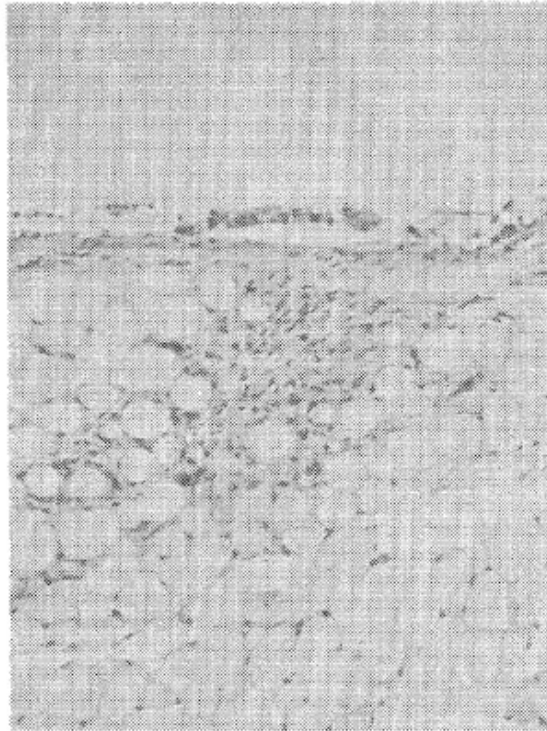


Fig. 8

