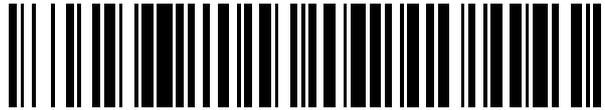


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 555 123**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.07.2004 E 04017315 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.10.2015 EP 1500697**

54 Título: **Tejido de prueba bioartificial vascularizado de manera primaria para un procedimiento de prueba farmacológico, procedimiento para su fabricación y procedimiento de prueba que utiliza dicho tejido, así como biorreactor para realizar el procedimiento**

30 Prioridad:

**24.07.2003 DE 10333863**

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

**29.12.2015**

73 Titular/es:

**FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR  
FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN  
FORSCHUNG E.V. (100.0%)  
Hansastraße 27c  
80686 München, DE**

72 Inventor/es:

**WALLES, THORSTEN, DR.**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**ES 2 555 123 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

5 Tejido de prueba bioartificial vascularizado de manera primaria para un procedimiento de prueba farmacológico, procedimiento para su fabricación y procedimiento de prueba que utiliza dicho tejido, así como biorreactor para realizar el procedimiento.

La presente invención se refiere a un procedimiento para someter a prueba un fármaco o un tratamiento de radioterapia.

10 En el marco de los desarrollos de fármacos, la influencia de los productos químicos utilizados y los fármacos recién desarrollados sobre el ciclo celular de todas las células desempeña un papel central, dado que se pretende reforzar o detener de manera dirigida su proliferación, sus tasas de síntesis o sus influencias angiogénicas. Para comprobar tales fármacos recién desarrollados se realizan antes de la fase clínica experimentos con animales, que documentan la eficacia, la toxicidad así como los efectos secundarios del nuevo producto correspondiente. Para ello,  
15 se utilizan en la mayoría de los casos sistemas de ratón atímico o animales grandes tales como cerdo, perro u oveja. Los resultados obtenidos en estos sistemas de animales no pueden transferirse directamente al ser humano. A pesar de la alta homología genética entre, por ejemplo, el ser humano y el ratón de por ejemplo el 92%, los resultados obtenidos de un modelo de ratón no pueden transferirse al sistema humano.

20 Por tanto, en los últimos años se han desarrollado de manera reforzada sistemas de cultivo celular, en los que células humanas entran en contacto *ex vivo* con los principios activos correspondientes. Así puede examinarse la influencia sobre su ciclo celular. Los cultivos celulares humanos se ponen en contacto con los diferentes fármacos esencialmente de manera bidimensional en un medio nutritivo y se examinan los efectos en función de diferentes parámetros. Sin embargo, se muestra que los cambios encontrados de los cultivos celulares no son necesariamente  
25 atribuibles al principio activo y por consiguiente, a su vez, tales resultados tampoco pueden equipararse directamente al efecto de un fármaco sobre el cuerpo humano. A este respecto, en los cultivos celulares tienen lugar en particular procesos de desdiferenciación en función del entorno correspondiente (microentorno), que conducen a cambios que son difíciles de diferenciar de los cambios debido a los fármacos suministrados.

30 El documento US 2001/039047 describe un procedimiento para producir un tejido bioartificial, tridimensional, con células vivas en o sobre una matriz, pudiendo cultivarse las células y la matriz en un tejido o en un tejido precursor. Además, están previstos un tejido vascularizado de material biológico, que se produce mediante un procedimiento de este tipo, y un reactor para su producción.

35 El documento WO 02/35992 A2 describe la formación de tejidos artificiales que requieren una superficie endotelial, tales como, por ejemplo, vasos sanguíneos y válvulas cardíacas.

40 El documento WO 03/043675 A describe la generación o reconstrucción de órganos reproductores femeninos artificiales, tales como, por ejemplo, el útero, la vagina y el cuello uterino. A este respecto, se perfunden poblaciones celulares de material celular adecuado.

El documento WO 02/064179 A2 describe una matriz de tejido con vascularización primaria, bioartificial, y un tejido correspondiente así como procedimientos para su producción y utilización.

45 La invención se basa en el objetivo de, con respecto a los sistemas conocidos, proporcionar mejoras y en particular posibilitar procedimientos de prueba de fármacos y tratamientos de radioterapia, que puedan transferirse de la manera más amplia posible al cuerpo humano.

50 Este objetivo se alcanza mediante un procedimiento según la reivindicación 1 así como un procedimiento según la reivindicación 5. Las reivindicaciones dependientes describen perfeccionamientos preferidos.

La invención se basa en el conocimiento de que la ausencia de coincidencias entre sistemas de cultivo celular *ex vivo* de células humanas y el cuerpo humano es atribuible en particular al entorno bidimensional de los sistemas de cultivo celular de este tipo. Estas nuevas células se multiplican *ex vivo* en el entorno bidimensional o  
55 cuasibidimensional y debido su microentorno bidimensional pueden someterse a procesos de desdiferenciación. Los procesos de desdiferenciación de este tipo pueden impedirse *in vivo* en particular por el medio de cultivo celular o componentes de matriz extracelulares.

60 Para evitar procesos de desdiferenciación de este tipo y reproducir las interacciones que tienen lugar en un complejo tisular tridimensional nativo, se aprovechan según la invención para la realización de los procedimientos de prueba conceptos de la técnica de implantación, de la denominada ingeniería tisular. Se recurre a células endoteliales, células tumorales o primarias humanas y una estructura de soporte vascularizada natural, es decir, matriz extracelular ECM, como sustituto de un complejo tisular tridimensional nativo. Una sustancia de prueba o un tratamiento físico puede actuar *in vitro* sobre las células, de modo que puede examinarse la influencia de un principio  
65 activo o del tratamiento físico sobre el ciclo celular, la proliferación y las tasas de síntesis en un microentorno natural o cuasinatural. Así pueden evaluarse, por ejemplo, los cambios en la tasa de generación de nuevos vasos

sanguíneos y las variaciones en el patrón de expresión de moléculas de adhesión endoteliales. Adicionalmente existe la posibilidad de examinar interacciones célula-célula y célula-matriz especiales a nivel de ARNm y de proteína. Los cambios encontrados pueden correlacionarse con la concentración de fármacos utilizadas y la duración de la aplicación, tras lo cual pueden cambiarse los parámetros correspondientes según la evaluación correspondiente.

Con esto, según la invención, en primer lugar se forma a partir de un tejido de partida biológico mediante descelularización una matriz de tejido biológica, vascularizada, bioartificial, esencialmente de colágeno. Con este propósito, el tejido ventajosamente se descelulariza completamente; en el caso de tomar tejido autólogo, puede llevarse a cabo, por ejemplo, también una descelularización sólo parcial. Una producción de este tipo de una matriz de tejido ya se conoce en sí misma del campo de la producción de implantes o ingeniería tisular, por ejemplo por el documento WO 02/064179 A2. A este respecto, puede utilizarse, por ejemplo, un tejido xenogénico de por ejemplo un cerdo, un tejido autólogo del propio paciente o un tejido alogénico de otro paciente humano, presentando el tejido por lo menos una rama vascular, preferentemente una rama vascular arterial y una venosa. Se suministran células endoteliales o células madre o células precursoras, que forman una red vascular en la matriz de tejido con vascularización primaria. De manera complementaria se suministran las células humanas relevantes para los procedimientos de prueba posteriores, en particular células tumorales. Además, en particular también pueden suministrarse células hepáticas. A este respecto, las células hepáticas presentan la propiedad ventajosa para los procedimientos de prueba de metabolizar los medicamentos suministrados y los productos de degradación.

Según la invención además pueden suministrarse también células madre o precursoras humanas, dado que estas pueden formar en el tejido diferentes tipos celulares de manera correspondiente a las condiciones de cultivo, por ejemplo células musculares o cartilaginosas. De este modo, según la invención se genera un tejido nuevo, que es muy adecuado para el siguiente procedimiento de prueba, en particular debido a su mayor tasa de división y regeneración así como debido a la ausencia de influencias previas. A este respecto, pueden utilizarse células madre adultas.

Por consiguiente, según la invención se produce un "sistema de órgano" *ex vivo*. A este respecto, se ha demostrado que para la formación de un sistema realista es necesaria una buena perfusión ya de la matriz de tejido durante la colonización con las células humanas. A este respecto, en particular también se mostró una formación buena y realista del tejido de prueba al suministrar de manera pulsada el medio nutritivo. Como medio nutritivo, ya durante la colonización con las células humanas puede suministrarse sangre, en particular sangre autóloga. Además, también ya durante la colonización pueden suministrarse fármacos al medio nutritivo, en particular a la sangre.

El tejido de prueba según la invención posibilita en particular dos campos de aplicación:

Por un lado, en el campo de la investigación básica pueden examinarse de este modo procesos farmacocinéticos y procesos radioterapéuticos en tumores o células primarias humanas. A partir de esto pueden desarrollarse nuevos agentes terapéuticos.

Por otro lado, para pacientes individuales o grupos de pacientes individuales en aplicaciones clínicas puede comprobarse y perfeccionarse la eficacia de conceptos terapéuticos específicos, preferentemente farmacológicos, en particular también de conceptos terapéuticos farmacológicos y de radioterapia combinados. En particular, en el caso de aplicaciones clínicas de este tipo es ventajoso el suministro de sangre del propio paciente durante la colonización y/o también durante el procedimiento de prueba. Por consiguiente, excepto por dado el caso una matriz de tejido no autóloga, compuesta esencialmente por colágeno, mediante la colonización con células tumorales o células primarias autólogas y la alimentación con sangre autóloga puede formarse un sistema cuasi de órgano *ex vivo* biológico, bioartificial y muy realista.

Según la invención, ventajosamente puede controlarse el metabolismo y dado el caso ajustarse. A este respecto, en particular se obtienen como resultado ventajas claras con respecto a los sistemas de cultivo celular bidimensionales conocidos. En particular, pueden examinarse series de medición en función de concentraciones de fármacos, condiciones de suministro, dado el caso tratamientos de radioterapia adicionales y alimentación con nutrientes adicionales.

La perfusión del sistema cuasi de órgano tiene lugar preferentemente en un biorreactor según la invención. El sistema de perfusión dispone de por lo menos uno, preferentemente cinco sistemas de adaptador/conexión para conductos de perfusión. Se perfunde disolución de cultivo por la luz del sistema de órgano a través de una entrada y una salida. Las ramas vasculares de la matriz biológica se conectan por separado a una unidad de perfusión y se someten a perfusión por la misma. La perfusión es posible en condiciones de perfusión laminares y pulsátiles. En perfusión y durante las condiciones de cultivo pueden obtenerse en todo momento muestras del perfundido y añadirse fármacos, disoluciones celulares u otros principios activos.

Según la invención, la producción del tejido de prueba puede realizarse ventajosamente en el mismo biorreactor que el siguiente procedimiento de prueba; a este respecto, pueden mantenerse las conexiones de la rama vascular arterial y venosa del tejido de prueba a los empalmes de admisión del biorreactor, de modo que pueden evitarse en

gran medida influencias desventajas mediante una extracción temporal de todo el tejido de prueba.

La invención se explica a continuación mediante un ejemplo.

5 El ejemplo se refiere a la producción y el cultivo de tejido tumoral tridimensional humano *in vitro* a partir de biopsias tumorales. De un paciente con tumor, con una neoplasia maligna poco común o que no responde a la terapia, se toman una biopsia de tejido del área tumoral así como 200 ml de sangre. Se diluye la muestra de sangre 1:1 con PBS y en cada caso se añaden 10 ml de esto a 20 ml de solución de Bicol. Se aíslan las células mononucleares mediante una centrifugación durante 20 min a 300 g sin freno y se lavan dos veces con PBS.

10 Las células mononucleares obtenidas sirven para la reendotelialización de una estructura de soporte biológica fabricada a partir de intestino de cerdo acelularizado con lecho vascular conservado con una rama vascular arterial y una venosa. La matriz de tejido obtenida mediante la acelularización se fija en un recipiente de incubación, que también se denomina biorreactor, y se perfunde con un medio nutritivo y células endoteliales o células madre y precursoras y forma así una red capilar y vascular intramural funcional, que se extiende de manera tridimensional por el tejido. A este respecto, para la perfusión puede utilizarse en particular sangre, preferentemente sangre del propio paciente, es decir autóloga.

20 El tejido tumoral, tras una extracción estéril, se dispone en una placa de Petri, se humecta con 2 ml de RPMI y se corta en trozos pequeños. Se eliminan el tejido necrótico y adiposo. Se incuban los fragmentos cortados con un tamaño pequeño del tejido tumoral con 400 IU de colagenasa/ml de solución de Hank durante 4 horas a 37°C. En función de la consistencia del tejido tumoral puede aumentarse la concentración de colagenasa hasta 1300-1500 IU/ml de solución de Hank y el tiempo de incubación hasta 15-24 horas. Sin embargo, para evitar formaciones de agregaciones celulares deben añadirse entonces 2 IU/ml de heparina a la solución de Hank. Tras la fase de incubación, se filtra la solución a través de un tamiz celular para separar el residuo celular. Se centrifuga la suspensión celular obtenida durante 10 min a 200 g y por consiguiente sedimentan las células tumorales. Se desecha el sobrenadante y se lava el sedimento celular dos veces con 20 ml de medio RPMI nuevo. Se determina el número de células en una cámara de recuento Neubauer, y se aplican las células tumorales con una densidad de células de  $1 \times 10^5$  sobre la matriz de tejido y se cultivan con perfusión.

30 En las condiciones de cultivo dadas se desarrolla *ex vivo* tejido tumoral vascularizado tridimensional humano. Tras una fase de cultivo de dos semanas, se incuban los tejidos tumorales bioartificiales con un fármaco. Para ello, se suministra el fármaco al medio nutritivo, preferentemente la sangre del propio paciente, a través de las ramas vasculares.

35 El efecto de la exposición al fármaco puede determinarse por medio de examen histológicos (por ejemplo HE, Pentachrom), inmunohistoquímicos, de bioquímica de proteínas (por ejemplo inmunotransferencia de tipo Western) o de biología molecular (por ejemplo RT-PCR).

40 En el dibujo adjunto se muestra un ejemplo de un biorreactor según la invención para realizar el procedimiento de producción y de prueba.

Muestran

45 la figura 1, una vista lateral del biorreactor según la invención y

la figura 2, una vista en planta del biorreactor según la figura 1 con la tapa retirada.

50 Los componentes iguales o correspondientes entre sí en las figuras del dibujo están dotados de los mismos números de referencia.

Un biorreactor 1 presenta un recipiente 2 de vidrio con una parte 3 inferior de recipiente y una tapa 3', que rodean una cámara 4 de cultivo tisular para alojar una matriz de tejido o del tejido 5 de prueba formado a partir del mismo. A la cámara 4 de cultivo tisular discurren conductos conectados de manera externa 6, 10, 12, 14, que comprenden un conducto de alimentación de medio de cultivo 6 que desemboca en el fondo o en la región inferior de la pared lateral para el suministro de un medio de cultivo 15, un conducto de alimentación arterial 10 con un empalme 11 para la conexión de una rama vascular arterial 13 del tejido 5 de prueba y un conducto de evacuación venoso 12 con un empalme 16 para la conexión de una rama vascular venosa 17 del tejido 5 de prueba.

60 Mediante el conducto de alimentación arterial 10 se suministra como medio nutritivo 20 preferentemente sangre del paciente, al que se le añade un fármaco (que también puede ser una mezcla de varios principios activos). A este respecto, el medio nutritivo se suministra de manera laminar o pulsada.

65 La temperatura de las disoluciones suministradas y evacuadas así como también del medio de cultivo 15 en la cámara 4 se regula. Además, se mide el valor de pH del medio de cultivo 15 en la cámara 4 y puede regularse.

Mediante el conducto de alimentación adicional 14 pueden tomarse muestras de la cámara 14 y dado el caso suministrarse principios activos. A este respecto, puede comprobarse, por ejemplo, el efecto de un citotóxico inyectado en el tejido de un paciente para el tratamiento de un tumor, suministrándose este a través del conducto de alimentación 14.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Procedimiento para someter a prueba un fármaco o un tratamiento de radioterapia, con por lo menos las siguientes etapas:
- 10 - producir un tejido de prueba con vascularización primaria, bioartificial, con las siguientes etapas: descelularizar por lo menos parcialmente un tejido de partida autólogo, alogénico o xenogénico con por lo menos una rama vascular, para dar una matriz de tejido biológico, con vascularización primaria, bioartificial, con por lo menos una matriz de una rama vascular y una red capilar, mantener la capacidad funcional de la rama vascular, perfundir la matriz de tejido con un primer medio nutritivo a través de la matriz de dicha por lo menos una rama vascular; revestir la rama vascular y la red capilar con células endoteliales, madre o precursoras y colonizar la matriz de tejido con células tumorales, madre, precursoras o hepáticas humanas,
  - 15 - suministrar el fármaco a un segundo medio nutritivo, que se suministra a dicha por lo menos una rama vascular, o someter el tejido de prueba a tratamiento de radioterapia, y
  - examinar el tejido de prueba.
- 20 2. Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado por que en la etapa de producción, el primer medio nutritivo es sangre, preferentemente sangre autóloga.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que en la etapa de producción, el tejido de partida se descelulariza completamente.
- 25 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que en la etapa de producción, la matriz de tejido se perfunde de manera pulsada durante la colonización.
- 30 5. Procedimiento para someter a prueba un fármaco o un tratamiento de radioterapia, con por lo menos las siguientes etapas:
- 35 - producir un tejido de prueba con vascularización primaria, bioartificial, que presenta una matriz de tejido biológica, con vascularización primaria, descelularizada con por lo menos una rama vascular, estando colonizada la matriz de tejido con células tumorales, madre, precursoras o hepáticas humanas, y presentando el tejido una red capilar y vascular,
  - suministrar el fármaco en un segundo medio nutritivo, que se suministra a dicha por lo menos una rama vascular, o someter el tejido de prueba a tratamiento de radioterapia, y
  - 40 - examinar el tejido de prueba.
- 45 6. Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado por que en la etapa de producción, la matriz de tejido presenta por lo menos una matriz de una rama vascular arterial y por lo menos una matriz de una rama vascular venosa.
7. Procedimiento según la reivindicación 5 o 6, caracterizado por que en la etapa de producción, dicha por lo menos una rama vascular está conectada con una red capilar intramural formada en la matriz de tejido.
- 50 8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 5 a 7, caracterizado por que en la etapa de producción, se irriga el tejido de prueba.
9. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que en la etapa de suministro de fármaco, el segundo medio nutritivo suministrado a dicha por lo menos una rama vascular es sangre, preferentemente sangre autóloga.
- 55 10. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que en la etapa de suministro de fármaco, el segundo medio nutritivo se suministra de manera pulsada.
- 60 11. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el tratamiento de radioterapia y el suministro del fármaco se realizan al mismo tiempo y/o separados en el tiempo.
12. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que en la etapa de examen, se examina el ciclo celular, la proliferación y las tasas de síntesis del tejido de prueba.
- 65 13. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que en la etapa de examen, se examinan los cambios en la tasa de generación de nuevos vasos sanguíneos y las variaciones en el patrón de expresión de moléculas de adhesión.

14. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que en la etapa de examen, se examinan las interacciones célula-célula y célula-matriz a nivel de ARN y de proteína.
- 5 15. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que en la etapa de examen, se examina un metabolismo del tejido de prueba mediante la comprobación del medio nutritivo suministrado y evacuado.

