

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 565 856**

51 Int. Cl.:

A61L 27/22 (2006.01)

A61L 27/58 (2006.01)

A61L 27/38 (2006.01)

A61L 27/60 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2008 E 08750425 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.12.2015 EP 2145635**

54 Título: **Procedimiento de preparación de estructuras tridimensionales para ingeniería tisular**

30 Prioridad:

29.03.2007 ES 200700835

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

07.04.2016

73 Titular/es:

CENTRO COMUNITARIO DE SANGRE Y TEJIDOS DE ASTURIAS (50.0%)

Emilio Rodríguez Vigil s/n

33006 Oviedo, Asturias, ES y

CENTRO DE INVESTIGACIONES ENERGÉTICAS, MEDIOAMBIENTALES Y TECNOLÓGICAS (50.0%)

72 Inventor/es:

MEANA INFIESTA, ÁLVARO;

GARCÍA PÉREZ, EVA;

GARCÍA DÍAZ, VERÓNICA;

JORCANO NOVAL, JOSÉ LUIS;

DEL RÍO NECHAEVSKY, MARCELA;

LARCHER LAGUZZI, FERNANDO;

DUARTE GONZÁLEZ, BLANCA y

HOLGUÍN FERNÁNDEZ, ALMUDENA

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 565 856 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

Procedimiento de preparación de estructuras tridimensionales para ingeniería tisular

Campo de la invención

5 La presente invención pertenece al campo de la ingeniería tisular y concretamente se refiere a un procedimiento para obtener estructuras tridimensionales para ingeniería tisular y a las estructuras obtenidas por dicho procedimiento. La invención también se refiere a un procedimiento ex vivo para regenerar un tejido usando las estructuras tridimensionales de la invención y al uso de las estructuras así tratadas para su trasplante a la zona a regenerar del paciente.

Antecedentes de la invención

10 La obtención de un tejido u órgano nuevo que pueda sustituir el dañado es uno de los objetivos de la medicina regenerativa. Para ello hay que recurrir a técnicas de Ingeniería Tisular, cuya base es la reconstrucción del órgano o tejido dañado a partir de pequeños restos de tejido sano (Sipe J et al, Ann N. Y. Acad. Sci. 961: xiii-xiv, 2002). La posibilidad de reconstruir un órgano o tejido dañado a partir de células de otros tejidos del organismo o incluso a partir de células embrionarias multipotentes se ha añadido en la actualidad a esta tecnología.

15 Las células son un elemento indispensable en la producción de nuevos tejidos. Las células constituyen el componente vivo de los tejidos y son las que realizan las funciones biológicas características del mismo (por ejemplo la producción de albúmina por los hepatocitos, la filtración por las células del glomérulo etc.). La tecnología del cultivo celular permite, a partir de un pequeño número de células presentes en un fragmento de tejido sano, aumentar su número en proporciones logarítmicas sin que estas células pierdan sus características. En algunos
20 casos también permite transdiferenciar células (por ejemplo de células grasas a células óseas) o incluso orientar células indiferenciadas hacia células de un tejido determinado (de células embrionarias hacia células productoras de insulina). Sin embargo, a pesar de toda esta tecnología desarrollada, no se pueden fabricar tejidos con las células aisladas, ya que en tales tejidos las células se encuentran distribuidas en una estructura tridimensional y esta distribución espacial es crítica para el desarrollo de la función del órgano o tejido. Esta estructura tridimensional está
25 proporcionada por la matriz extracelular de los tejidos. Esta matriz, no es solo una estructura para sostener las células, sino que presenta motivos de adhesión para que las células queden convenientemente fijadas. La matriz extracelular se produce y se destruye de forma coordinada por las propias células que componen el órgano o tejido. Por este motivo, en la mayoría de los modelos de ingeniería tisular, es necesario proporcionar a las células previamente cultivadas una estructura o soporte (scaffolds) para que, una vez introducidas en ella y colocadas en
30 tres dimensiones, las células comiencen a comportarse de la manera más fisiológica posible (Godbey WT and Atala A. Ann N. Y. Acad Sci. 961: 10-26, 2002).

Desafortunadamente no existe tecnología suficiente para producir matrices extracelulares semejantes a las de los tejidos adultos. La búsqueda de estas estructuras tridimensionales, soportes, andamiajes es uno de los campos de investigación más importantes en el campo de la Ingeniería Tisular (Griffith L, Ann N. Y. Acad Sci, 961: 83-95, 2002).

35 El andamiaje no solo debe proporcionar una estructura tridimensional, es necesario que las células sean capaces de adherirse a él. El producto base del andamiaje no debe contener sustancias tóxicas para las células. También precisa otras características, tales como la resistencia mecánica (variable según el órgano o tejido a reconstruir) o la capacidad de degradación. El andamiaje ideal debe degradarse y permitir que sea sustituido por la matriz extracelular normal del tejido correspondiente. El andamiaje, debe tener una estructura que permita a las células
40 acceder a su interior, por lo que la mayoría de estas estructuras se fabrican de materiales porosos. Multitud de sustancias han sido utilizadas como andamiajes en Ingeniería Tisular, esto da una idea de la complejidad de las necesidades que un andamiaje ideal debe tener.

Algunos biopolímeros han sido empleados ampliamente como andamiaje. Los poli(alfa-hidroxiácidos) (Kulkarny et al, Arch Surg, 93: 839-843, 1993), tal como el ácido poliglicólico (PGA) o el ácido poli-L-láctico (PLLA) o combinaciones de ambas sustancias (PLGA) destacan entre ellos.
45

Otras sustancias de origen biológico utilizadas en el desarrollo de andamiajes son los hialuronatos (Itay S et al, Clin Orthop, 220: 234-300, 1987), los derivados de la quitina de las conchas marinas (chitosán) (Prasitsilp et al, J Mat Sci: Mat in Med, 11: 773-778, 2000) o los alginatos (Fragonas et al, Biomaterials 21: 795-801, 2000).

50 Otra posible fuente de andamiaje son los compuestos que son la base de la matriz extracelular en los mamíferos, el ejemplo más claro es el uso de geles de colágeno tipo I para desarrollar modelos de Ingeniería Tisular (Maraguchi et al, Plast Reconstr Surg, 93: 537-544, 1994). Otra sustancia muy utilizada como andamiaje es el fibrinógeno presente en el plasma (Gurevitch O et al, Tissue Engineering 8: 661-672, 2002, Meana et al, Burns 621-630, 1998).

55 Un producto biológico utilizado ampliamente en terapéutica es la albúmina. La albúmina humana o de otra especie de mamífero se obtiene a partir del plasma. La albúmina se utiliza normalmente en infusión venosa, aunque también se ha utilizado como pegamento biológico, mezclándola con un producto de reticulación que comprende un aldehído, generalmente el glutaraldehído. Esta mezcla utilizada en terapéutica produce un adhesivo tisular utilizado

en cirugía y descrito en la solicitud WO 2005/00925. También se describe un modelo en forma de estructura tridimensional basado en albúmina-glutaraldehído, que podría reforzarse mediante la inclusión de fibras y/o otros componentes y que podría implantarse en el organismo (documento WO 00/70018). Otros usos de este modelo descritos en el estado de la técnica son el uso como microesferas para la dispensación gradual de fármacos (documento US 4349530). Sin embargo, el uso de esta estructura como andamiaje o soporte para técnicas de Ingeniería Tisular no ha sido posible ya que es una estructura maciza, sin poros en su interior al que puedan acceder las células. Además, el glutaraldehído no es un producto apropiado en la preparación de matrices aptas para cultivar células, ya que hace que la matriz sea muy poco degradable y tiende a bloquear las proteínas necesarias para la adhesión celular (Biopolymer methods in Tissue Engineering, Hollander P y Haltton PV ed., pg. 11, Humana Press, 2004). El glutaraldehído que resta en la estructura es muy tóxico para las células y las células sembradas en la superficie de los compuestos albúmina-glutaraldehído mueren mal y/o mueren. Una posibilidad para situar células en su interior es mezclar la albúmina con las células previamente al empleo de la solución de reticulación, sin embargo esto tampoco es posible por la toxicidad antes referida. Existe en el estado de la técnica una posibilidad para hacer porosa esta estructura, como es la mezcla con partículas tipo carbonato cálcico (WO 00/70018), sin embargo esto obliga a tratar la mezcla con soluciones ácidas para eliminar las partículas, el glutaraldehído residual permanece y este producto resulta tóxico y poco recomendable como andamiaje para el desarrollo "in vitro" de técnicas de Ingeniería Tisular.

Otros andamiajes de albúmina han sido descritos como porosos, bien por el uso de un material de construcción porosa inocuo, tal como microesferas de PEG (documento WO2006/099137), NaCl (documento 2004/108810), bicarbonato (documento US2002/059001) o por el propio procedimiento de preparación (documento DE3517456).

El desarrollo de andamiajes o soportes para Ingeniería Tisular a partir de proteínas globulares, tales como la albúmina, precisa de otros sistemas que eliminen la toxicidad de la sustancia de reticulación, proporcionen una estructura porosa y a ser posible incluyan en la misma motivos que favorezcan el anclaje de las células.

Breve descripción de la invención.

Un primer objetivo de la presente invención, es un procedimiento para obtener estructuras tridimensionales no tóxicas, para desarrollar modelos de ingeniería tisular, a partir de las proteínas globulares del plasma (concretamente la albúmina), entrecruzadas por un agente de reticulación (preferentemente glutaraldehído). La mezcla proteína-reticulante se congelará y posteriormente se someterá a liofilización. Una vez liofilizado, el producto resultante debe ser hidratado para que tenga resistencia y elasticidad. La hidratación se realiza mediante el empleo de etanol en concentraciones decrecientes. Finalmente se lava el exceso de etanol en medio de cultivo o solución salina equilibrada. Se origina así un soporte poroso, flexible, que puede ser cortado con facilidad sin rotura.

Un segundo objetivo de la invención es la estructura tridimensional o andamiaje obtenible por el procedimiento referido anteriormente.

La estructura o andamiaje así diseñados se pueden utilizar tras su siembra con diferentes tipos celulares en un procedimiento para regenerar ex vivo el tejido u órgano dañado. Las células se adhieren a esta estructura y son capaces de crecer y/o diferenciarse, comenzando la síntesis de proteínas de la matriz extracelular.

Finalmente el andamiaje de la invención con las células en su interior puede ser trasplantado a un ser vivo, en el que la respuesta inmune producirá una reabsorción progresiva del andamiaje y las células producirán la matriz extracelular normal del tejido.

El resultado final será la reparación de un órgano o tejido dañados mediante Ingeniería Tisular.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: la imagen representa el soporte o andamiaje de la invención observado al microscopio de barrido (X500) realizado a partir de albúmina al 20 % (izquierda) y un corte histológico del mismo (derecha).

Figura 2: adhesión de fibroblastos humanos a un soporte o andamiaje realizado directamente con plasma humano. A la derecha expresión de colágeno tipo I (la proteína extracelular más importante de la dermis) por estos fibroblastos.

Figura 3: preadipocitos extraídos a partir de grasa subcutánea de conejo, sembrados sobre una estructura realizada directamente con suero de conejo. Las células fueron cultivadas 45 días en estufa en medio adipogénico (izquierda, tinción aceite rojo) y medio osteogénico (derecha, tinción de Von Kossa).

Figura 4: estructura tridimensional de acuerdo con la invención observada con un microscopio electrónico de barrido (X200). A la derecha soporte realizado con albúmina al 5 % y a la izquierda con albúmina al 20 %.

Figura 5: Imagen tomada por microscopio de barrido (X4000). Superficie de los diferentes soportes. Arriba y a la izquierda, albúmina al 20 %, a la derecha soporte directamente realizado con suero. Abajo. Soporte realizado a partir de plasma.

Figura 6: esquema de un prototipo del soporte de la presente invención en el interior de una dermis artificial basada en plasma y fibroblastos. El soporte proporciona a la dermis basada en fibrina y fibroblastos una consistencia que facilita el trasplante de la misma.

5 Figura 7: Estructura de una piel tricapa: en la parte inferior adipocitos diferenciados sobre el andamiaje de la presente invención, en la parte media fibroblastos en gel de plasma y en la superior queratinocitos.

Descripción detallada de la invención.

En primer lugar la invención se refiere a un procedimiento para obtener estructuras tridimensionales para ingeniería tisular que comprende:

- 10 a) mezclar una fuente de albúmina y un agente de reticulación e introducir la mezcla en un molde con la forma de la estructura que se ha de obtener
- b) congelar lenta y progresivamente la estructura sólida obtenida en a)
- c) liofilización de la estructura de b)
- d) rehidratación progresiva de la estructura de c) por medio de inmersión sucesiva en alcoholes de graduación descendente.

15 En el contexto de la invención la fuente de albúmina puede ser un preparado purificado de albúmina o puede ser albúmina directamente obtenida del suero o plasma del propio paciente, al que posteriormente se le vaya a implantar la estructura o andamiaje con las células. El hecho de que se use el propio suero o plasma del paciente tiene la ventaja de que se minimizara la respuesta inmune de rechazo al implante. Además el uso de plasma o suero del

20 paciente frente a preparados de albúmina tiene la ventaja de que proporciona más motivos de unión o anclaje a las células que posteriormente se sembrarán en la estructura de la invención, ya que no solo presenta los motivos propios de la albúmina sino del resto de proteínas presentes en la sangre.

La concentración de albúmina utilizada para la elaboración de las estructuras tridimensionales de la invención dependerá de la aplicación que se le vaya a dar a la misma, es decir, del tipo de tejido que se pretenda regenerar. Por lo general, se pueden usar concentraciones de entre 1-50 % de albúmina.

25 Como agente de reticulación se puede utilizar cualquiera que produzca el efecto de desnaturalizar y entrecruzar las moléculas de albúmina aunque se prefiere el uso de de agentes tipo aldehído como el formaldehído o glutaraldehído. Este último es especialmente preferente. La concentración del agente de reticulación usado en la mezcla con la fuente de albúmina puede estar al 0,1-9 %, preferentemente al 0,5-7,5 %.

30 La reacción de la mezcla albúmina-agente de reticulación en un molde con forma predeterminada permite que al hacerse sólida la estructura resultante adquiera la forma del molde. De este modo se puede adecuar la forma de la estructura al defecto que se quiera suplir o del tejido dañado que se quiera regenerar.

35 Después de la congelación lenta y progresiva de la estructura tridimensional obtenida, preferentemente a un ritmo de 1° C/min hasta una temperatura de -70° C, se lleva a cabo un paso clave de la invención. Este paso supone someter la estructura maciza obtenida tras el entrecruzamiento y la congelación a una liofilización. La liofilización produce la anulación del efecto tóxico del agente de reticulación pero, además, produce un material de amplia porosidad, ya que eliminamos la totalidad de la fracción acuosa del andamiaje (al mismo tiempo se elimina el agente de reticulación no fijado a la proteína globular).

40 El producto así obtenido es muy friable y no ofrece suficiente resistencia mecánica para su utilización. Para mejorar estas características, este producto liofilizado debe ser hidratado. Esta hidratación se debe realizar, preferentemente, de forma lenta y progresiva para evitar roturas. La hidratación se realizará mediante el tratamiento con alcoholes en graduación descendente, preferentemente mediante la inmersión en alcohol absoluto, alcohol de 96°, 90°, 80°, 70° y 50°. La estructura obtenida tras la hidratación será lavada en medio de cultivo o en solución equilibrada de sal, para eliminar los restos de alcohol que pudieran quedar.

45 El resultado final de este procedimiento, que es también objeto de la invención, es una estructura tridimensional porosa, elástica, no tóxica (figura 1) en la que pueden sembrarse células cultivadas que son capaces de adherirse al andamiaje de la invención.

El siguiente objetivo de la presente invención se deriva gracias a esta capacidad de la estructura tridimensional de adherir células. Este objetivo es un procedimiento ex vivo para regenerar un tejido que comprende:

- a) sembrar células en la estructura tridimensional anteriormente descrita;
- 50 b) incubar las células en un medio de cultivo dentro de una estufa o biorreactor hasta el momento en que la estructura se vaya a implantar en el paciente.

El andamiaje o estructura tridimensional con estas células sembradas en su interior ya sea por agitación, agitación intermitente o en un biorreactor, se puede mantener "in vitro" en estufas de cultivo celular o en biorreactores. Durante este periodo, las células pueden seguir creciendo, se comportan de una manera fisiológica (figura 2) y según los factores de crecimiento o diferenciación presentes en el medio de cultivo, expresar el fenotipo completo de la estirpe celular sembrada o ser diferenciados hacia células de otros tipos de tejidos (figura 3). Este crecimiento y/o diferenciación se realiza sin que se aprecie una degradación de la parte estructural del andamiaje de la invención, incluso por periodos de hasta 6 meses de cultivo "in vitro". En una realización preferente de la invención las células sembradas y cultivadas y/o diferenciadas son osteoblastos, preadipocitos, condrocitos o fibroblastos dérmicos.

Finalmente, el producto de la invención así manipulado, que es también objeto de la invención, puede ser trasplantado a un ser vivo, en el que la estructura originada por el entrecruzamiento de la albúmina será degradada por parte del sistema inmunitario del individuo, las células aportadas continuarán con la producción de matriz extracelular que irá sustituyendo lentamente a la estructura proteica inicial. El resultado de este trasplante, originará como producto final un nuevo tejido u órgano capaz de suplir la parte dañada, objetivo final de los procesos de Ingeniería Tisular.

Modo de realización de la invención

La base del producto de la invención son las proteínas globulares del plasma entrecruzadas con una sustancia tipo aldehído. La albúmina es la principal proteína del plasma y es la base estructural del producto y puede ser utilizada a diferentes concentraciones con resultados estructurales distintos, (entre el 50 y el 4 %) (figura 4). La sustancia de reticulación, por ejemplo el glutaraldehído puede también utilizarse a diferentes concentraciones, entre el 0,5 y el 7,5 % con respecto al volumen de albúmina.

Tras la mezcla, esta se deposita en un molde y se produce la rápida solidificación. El producto se desmolda y se somete a una congelación lenta y progresiva. Una vez congelado el producto se somete a liofilización, cuando esta finaliza el producto de la presente invención tiene un aspecto poroso pero es extremadamente friable y se rompe ante una mínima fuerza. Para lograr un producto utilizable como soporte o andamiaje se debe hidratar. La hidratación produce un cambio drástico en las características físicas del producto, volviéndolo elástico y resistente a la manipulación. Si este producto se hidrata bruscamente parte de la estructura se puede romper, por lo que es conveniente someterlo a una hidratación progresiva. Para ello, se introduce el producto en alcohol etílico absoluto (entre una y ocho horas dependiendo del tamaño de la estructura), posteriormente se introduce en alcohol de 96°, 90° y 80°, durante el mismo periodo de tiempo. Tras el paso por el alcohol de 80° las características físicas del producto cambian, el producto es más elástico, los poros son más visibles y se puede cortar en finas láminas. Se continúa con la hidratación del producto, dejándolo en alcohol de 70° durante 24 horas, alcohol de 50° y de aquí en medio de cultivo (DMEM, RPMI...) o soluciones salinas equilibradas. Se cambia la solución salina al menos 3 veces para eliminar todos los restos de alcohol presentes. El producto final es una esponja elástica en la que pueden verse los poros con claridad. Este producto puede almacenarse en el medio de cultivo durante meses sin perder su capacidad funcional.

Se ha comentado previamente que la concentración de albúmina para la realización del producto podría ser muy variable. Cuando se utilizan concentraciones de albúmina bajas (4 %), el producto es ligeramente menos resistente que con albúminas al 20 %. Sin embargo, cuando se utilizan concentraciones bajas de albúmina el producto sigue siendo estable y elástico. El plasma humano contiene entre el 3 y el 5 % de albúmina, por lo que este andamiaje se podría realizar directamente a partir de plasma humano. El empleo directo de plasma o suero en la producción del andamiaje permite la posibilidad de fabricar una estructura tridimensional partiendo directamente de la sangre del paciente, al que será posteriormente implantado. Para ello, mediante venopunción, se extraería una pequeña cantidad de sangre del paciente (entre 10 y 100 ml) dependiendo del tejido a reconstruir, en medio sin anticoagulante (suero) o con él (plasma). Se centrifuga para quitar el componente celular de la sangre y se mezcla con el glutaraldehído, se coloca en el molde y se deja que el producto solidifique. A partir de aquí se continúa con la congelación lenta, la liofilización y la hidratación progresiva. El resultado final es un producto aparentemente semejante al preparado con la albúmina a bajas concentraciones, una estructura tridimensional, en la que células de mamífero pueden ser sembradas. Este soporte ha perdido totalmente su toxicidad. Los soportes/andamiajes generados a partir de plasma o suero son claramente diferentes de los generados directamente a partir de concentrados de albúmina, ya que en ellos también están presentes otras proteínas normalmente presentes en la sangre. Esta diferencia produce también cambios importantes en la función del andamiaje, que se comentarán en el siguiente párrafo.

Una vez conseguida la estructura tridimensional, se procede a la siembra de células. Uno de los grandes problemas de la mayoría de los andamiajes previamente diseñados son que no aportan las señales necesarias para facilitar el anclaje de las mismas al soporte, ya que la interacción células soporte es un proceso dinámico en el que la células reconoce una superficie favorable y, una vez iniciado el contacto físico, las células comienzan a sintetizar las proteínas específicas de unión con la matriz extracelular. Los estudios previos, realizados con el andamiaje de la presente invención muestran que las células tienen una capacidad limitada para unirse directamente a los andamiajes de albúmina, sin embargo esta capacidad aumenta hasta hacerse al menos 10 veces mayor cuando se utilizan andamiajes realizados directamente con suero o preferentemente con plasma. El estudio estructural realizado mediante microscopía electrónica de barrido, demuestra que la superficie de estas estructuras es muy

diferente (figura 5). Estas claras diferencias son debidas a que en el suero y en el plasma existen muchas más proteínas que en un preparado purificado de albúmina y parte de esas proteínas serán atrapadas dentro del entrecruzamiento producido entre la albúmina y el agente de reticulación.

- 5 Esto posibilita, dependiendo de la estrategia a seguir, la utilización de andamiajes diferentes dependiendo de si lo que interesa es una mayor proliferación de las células (preferentemente las células crecen mejor en adhesión) o una mayor diferenciación de las mismas.

Una vez conseguido el andamiaje, este se puede guardar sin perder sus características dejándolo en medio de cultivo, o se puede utilizar. Para ello se procede a sembrar las células propias del tejido a regenerar. Para la siembra se pueden seguir diversas estrategias (agitación, agitación intermitente, biorreactor...).

- 10 El andamiaje sembrado con el componente celular quedará entonces en la estufa o biorreactor hasta el momento del implante. Este periodo de tiempo será muy variable según el tipo celular empleado y el grado de diferenciación que las células precisen. Durante este periodo se puede observar como las células se fijan al andamiaje y como comienzan a producir las proteínas específicas del tejido adulto. Por ejemplo, si a un andamiaje de acuerdo con la invención se le siembran fibroblastos y se le deja en un medio de crecimiento típico (por ejemplo DMEM, 10 %
 15 Gracias a esta capacidad de la estructura tridimensional de adherir células se deriva suero fetal de bovino) se observa como a los pocos días de la siembra los fibroblastos comienzan a sintetizar colágeno tipo I (figura 2). Si por ejemplo se siembran sobre este andamiaje células cultivadas a partir de implantes óseos y dejamos estas células en medio de osteogénesis observaremos a los pocos días como las células depositan sales de calcio sobre el andamiaje, y expresan el enzima fosfatasa alcalina. Si se siembran condrocitos cultivados y se coloca el andamiaje
 20 en medio de diferenciación condral se observará la producción de colágeno tipo II. Cuando se siembran células más indiferenciadas, los plazos necesarios para el intervalo entre la siembra y el andamiaje pueden ser mayores. Un ejemplo sería cuando sembramos células madre de mesénquima obtenidas a partir de una biopsia de grasa subcutánea y las dejamos en medio osteogénico, se precisa un periodo superior a los 15-20 días de cultivo "ex vivo" para ver la expresión de proteínas propias del hueso. A pesar de estos periodos tan prolongados el andamiaje de la presente invención no se digiere (o lo hace mínimamente) y conserva la estructura tridimensional sin alteraciones en
 25 cultivo "ex vivo" hasta 6 meses después de la siembra.

Finalmente y una vez conseguida "ex vivo" la estructura y diferenciación celular deseada, el andamiaje de la presente invención puede ser trasplantado.

- 30 Tras el trasplante un andamiaje siempre se comporta como un cuerpo extraño y generará una respuesta inflamatoria. Esta respuesta deberá ser moderada y producir una degradación paulatina y controlada del material extraño. Los estudios "in vivo" relacionados con el andamiaje de la presente invención muestran una muy moderada degradación sin objetivarse una gran inflamación en la zona del trasplante. Mientras la estructura del andamiaje original es degradada, se produce la integración de la nueva matriz extracelular producida por las células sembradas en el andamiaje, generándose un nuevo tejido que puede reproducir las funciones del tejido originalmente dañado.

- 35 En resumen el andamiaje de la presente invención permite una serie de ventajas que lo diferencian claramente de lo previamente conocido en el estado de la técnica:

- Aporta una estructura tridimensional para las células, pero también aporta a la vez señales de adhesión. Esto confiere al producto una composición idónea para el desarrollo de modelos de Ingeniería Tisular.
- Es un andamiaje que permite el cultivo "in vitro" durante largos periodos (hasta 6 meses), sin pérdida de la
 40 estructura tridimensional. Esto permite el desarrollo de modelos de diferenciación "in vitro".
- Es un material biológico ampliamente empleado en la clínica.
- El producto original es de muy fácil obtención (concentrados de albúmina) o sangre total (venopunción).
- La posibilidad de construir un soporte para ingeniería tisular, a partir de pequeñas cantidades de sangre total, ofrece la posibilidad de obtener estas estructuras partiendo de productos biológicos autólogos, es decir,
 45 obtenidos del propio paciente al que van a ser implantados.

Los siguientes ejemplos describen la utilización de este andamiaje en medicina regenerativa, aunque no pretenden ser limitativos respecto al ámbito de la invención.

Ejemplo 1: Preparación de un andamiaje para reparar una artrosis en una diáfisis femoral con albumina al 20 %

- 50 El andamiaje tipo para pseudoartrosis en una diáfisis femoral posee una dimensión aproximada de 3 cm de diámetro por 2 cm de altura. Para su preparación se partió de 10 ml de albúmina humana al 20 % de la que habitualmente se utiliza en la clínica para su infusión. La albúmina se mezcló con 1 ml de glutaraldehído al 25 % e inmediatamente después se depositó en un molde de las dimensiones antes referidas. Se dejó solidificar la mezcla a temperatura ambiente durante 30-45 minutos y posteriormente se colocó en un refrigerador eléctrico a -80° C durante 18-24

horas. Una vez congelado el andamiaje se desmoldó y sin descongelar se introdujo en el liofilizador hasta que la muestra quedó totalmente liofilizada. Finalizado este proceso la muestra se colocó en alcohol etílico absoluto durante 2 horas. Entonces, el andamiaje se pasó a etanol al 96 % y se dejó durante otras 2 horas. El etanol a 96 % se sustituyó por etanol al 80 % y posteriormente por etanol al 70 % donde se dejó a temperatura ambiente durante 24 horas. Tras esta incubación el andamiaje se introdujo durante 2 horas en etanol al 50 %, en agua pura estéril y finalmente en una solución isotónica tipo PBS, solución de Ham o incluso medio de cultivo tipo RPMI o DMEM. Se lavó varias veces con esta solución para eliminar todos los restos de etanol que pudieran quedar en el producto. Tras esta incubación se tomó una mínima muestra del andamiaje para control bacteriológico y el andamiaje se dejó en la solución salina hasta su utilización.

10 **Ejemplo 2: Preparación de un andamiaje para reparar cartílago articular con plasma del paciente**

Para reparar una lesión aguda del cartílago articular de la rodilla se utilizó directamente plasma procedente del propio paciente. En primer lugar mediante procedimientos radiográficos (resonancia nuclear magnética), o mejor durante la exploración artroscópica de la rodilla lesionada, se midió aproximadamente la lesión condral a reparar. Al mismo tiempo esta artroscopia permitió la toma de una mínima biopsia del cartílago articular sano para cultivo y expansión "ex vivo" de estas células.

15 También en ese momento se extrajeron 10 ml de sangre en EDTA, esta sangre se centrifugó, por ejemplo a 3000 rpm durante 10 minutos. Tras la centrifugación se recogió el plasma, 3 ml de este plasma se mezclaron con 300 µl de glutaraldehído al 25 % y se colocó en una placa Petri de 35 mm de diámetro, se dejó que la mezcla solidificase (30-60 minutos) y se colocó en un congelador eléctrico a -80° C hasta el día siguiente. Sin descongelar se desmoldó y se colocó en un liofilizador hasta que el producto quedó completamente liofilizado. Tras esto se introdujo en etanol absoluto unas 2 horas y se pasó por etanol al 96 %, al 80 % y al 70 %, en el que quedó unas 18-24 horas.

20 Posteriormente se colocó durante 2 horas en etanol al 50 % y en solución salina tipo PBS o medio de cultivo. Se tomó muestra para control bacteriológico del andamiaje así preparado. Se lavó al menos 3 veces con la solución salina para eliminar los restos de etanol. En esta fase se ajustó el tamaño del andamiaje al de la lesión cartilaginosa, cortando este por ejemplo con un bisturí. El andamiaje quedó listo para ser sembrado de células.

25

Ejemplo 3: Regeneración de hueso maxilar para implantes dentales

A un paciente que precisaba implantes dentales y no poseía suficiente masa ósea se le extrajeron 10 ml de sangre y se llevó a cabo un proceso similar al del ejemplo 2 pero usando un molde muy similar al defecto que debía ser regenerado. Al mismo tiempo se le extrajeron unos pequeños fragmentos esponjosos del maxilar. Tras la congelación del material, liofilización e hidratación del mismo el andamiaje se reservó para la siembra de células e implante. Los fragmentos del hueso del paciente se sembraron sobre un frasco de cultivo celular por la técnica de explantes y se esperó a que crecieran las células viables presentes. Tras el crecimiento, las células se subcultivaron según las diferentes técnicas descritas. Una vez alcanzó una masa celular de células óseas suficiente, se sembraron sobre el andamiaje, se dejaron un periodo de tiempo en la estufa para que las células prendiesen y se trasplantaron a la zona a reconstruir. El andamiaje se fue degradando lentamente y las células que contiene produjeron la matriz adulta del hueso.

30

35

Ejemplo 4: Regeneración de hueso maxilar para implantes dentales

Se siguió otra estrategia similar a la del ejemplo 3 con otro paciente. En vez de extraer un fragmento de hueso, se utilizó como fuente celular una pequeña biopsia de grasa subcutánea. La grasa se digirió en colagenasa y las células se sembraron en un frasco de cultivo celular en medio de crecimiento (DMEM, 10 % de suero fetal de bovino). Tras alcanzar una masa crítica, los preadipocitos cultivados se sembraron sobre el andamiaje y se dejaron en medio de diferenciación ósea, hasta que por el seguimiento se apreciaron signos de diferenciación hacia osteoblasto. Posteriormente el andamiaje y las células que contenían se trasplantaron al defecto maxilar a regenerar.

40

45 **Ejemplo 5: Regeneración de una deformidad del pabellón auricular**

Una deformidad del pabellón auricular se reparó mediante el empleo de un andamiaje de suero del paciente. Los materiales y procedimientos son sustancialmente aquellos usados en el ejemplo 2, aunque el andamiaje se endureció sobre un molde que reproducía la estructura del cartílago de la oreja. Al mismo tiempo se tomó una pequeña muestra sana del cartílago auricular del paciente. Por un lado el andamiaje se congeló, liofilizó e hidrató según la metodología descrita en el ejemplo 2. Por otra parte el cartílago se digirió sometiénndose a enzimas proteolíticas y los condrocitos obtenidos se cultivaron hasta obtener una masa celular suficiente para ser sembradas sobre el andamiaje. Tras la siembra, los condrocitos sufrieron un proceso de rediferenciación mediante cultivo en estufa (25-45 días) y finalmente se trasplantaron a la zona lesionada.

50

Esta misma estrategia podría seguirse para la reparación de un cartílago articular, cambiando el origen de la fuente de condrocitos.

55

Ejemplo 6: Regeneración del tejido graso subcutáneo

Se tomó sangre de la paciente, se realizó el andamiaje de la forma descrita en el ejemplo 2 y se sembró con preadipocitos cultivados a partir de una biopsia de tejido graso de la paciente. Una vez sembrado en andamiaje, este se quedó cultivando en la estufa en medio de diferenciación adiposa hasta que las células sembradas comenzaron a acumular triglicéridos en su interior. Posteriormente se trasplantó a la región a reconstruir.

Esta misma estrategia podría seguirse tras las mastectomías debidas a neoplasias de mama

Ejemplo 7: Reconstrucción ósea

Un andamiaje para reconstrucción de lesiones óseas se puede desarrollar como en el ejemplo 1. Sin embargo, puede que algunas reconstrucciones óseas requieran una mayor consistencia del andamiaje que el basado en plasma o suero, por lo que se añadiría al plasma o suero del paciente un porcentaje de albúmina humana para reforzar la estructura, manteniendo las propiedades de anclaje celular. Finalmente este andamiaje podría ser sembrado con células del paciente extraídas a partir de una biopsia ósea o como en el ejemplo 4 de grasa subcutánea.

Ejemplo 8: Regeneración dérmica tras una quemadura

La base de este tratamiento consistió en la producción de láminas de pequeño grosor del andamiaje de la presente invención, sembrados a partir de fibroblastos dérmicos del propio paciente y trasplantados sobre el sitio de la lesión. En esta modalidad los fibroblastos podrían ser de otro paciente sano dado que los fibroblastos son células con escaso poder de generar rechazo inmunológico. Este prototipo de andamiaje en forma de lámina más fibroblastos dérmicos se puede asociar a membranas semipermeables tipo silicona, que proporcionan un efecto de barrera y protegen la herida y el implante de posibles infecciones.

Este tipo de estrategia podría usarse en otras lesiones de la piel (úlceras, amputaciones quirúrgicas en el pie diabético)

Ejemplo 9: Estructura de refuerzo

El andamiaje de la presente invención también puede ser utilizado como estructura interna de refuerzo de otros materiales ya empleados en ingeniería tisular. Un ejemplo de esta aplicación es la asociación de una lámina del prototipo aquí descrito a una lámina de plasma que contiene fibroblastos vivos. En este ejemplo el plasma humano conteniendo fibroblastos se siembra sobre una lámina del andamiaje de la invención, se añade cloruro cálcico para coagular el plasma y el andamiaje queda en el interior del plasma sirviendo de armazón interno y facilitando el trasplante de esta dermis artificial. También si se siembran queratinocitos sobre esta dermis artificial se consigue una piel artificial con un armazón interno que le aporta rigidez y facilita el trasplante. En la figura 6 se esquematiza este prototipo.

Ejemplo 10: Prototipo de piel artificial

Este prototipo puede ser asociado con un modelo de piel artificial definido en el ejemplo 9 para generar una piel cultivada tricapa que incorpore grasa subcutánea.

Para ello a partir de una pequeña biopsia de grasa se obtienen las células que se cultivan en un medio de expansión (DMEM 10 % de suero bovino). Cuando se alcanza un número suficiente de células, estas se siembran en el andamiaje de presente invención y se cultivan en un medio de diferenciación hacia adipocito. Cuando las células presentan signos de diferenciación grasa (figura 3, izquierda), se añade al andamiaje, fibroblastos dérmicos, plasma y se recalcifican para provocar la coagulación. Sobre su superficie se siembran los queratinocitos epidérmicos y se cultivan hasta que se hacen confluentes. El modelo que se obtendría sería una parte inferior con células grasas unidas al andamiaje de la presente invención, uniéndose a él una capa inmediatamente superior de plasma con fibroblastos semejante a la dermis humana y en la parte superior una capa epitelial (figura 7), es decir una piel humana con 3 capas mucho más parecida a la natural que la generada con estrategias diferentes.

45

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de estructuras tridimensionales para ingeniería tisular que comprende:
 - a) mezclar una fuente de albúmina y un agente de reticulación e introducir la mezcla en un molde con la forma de la estructura que se ha de obtener
 - 5 b) congelar lenta y progresivamente la estructura sólida obtenida en a)
 - c) liofilización de la estructura de b)
 - d) rehidratación progresiva de la estructura de c) por medio de inmersión sucesiva en alcoholes de concentración decreciente.
- 10 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la fuente de albúmina se selecciona entre un preparado purificado de albúmina, suero o plasma.
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el agente de reticulación es un aldehído.
4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el aldehído es glutaraldehído.
5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la fuente de albúmina posee una concentración de albúmina entre el 1 % y el 50 %.
- 15 6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la fuente de albúmina posee una concentración de 3-5 %.
7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el agente de reticulación posee una concentración entre el 0,1 y el 9 %.
- 20 8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el agente de reticulación posee una concentración de 0,5-7,5 %.
9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la congelación se hace a un ritmo de -1° C/min hasta una temperatura de -70° C.
- 25 10. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la rehidratación progresiva se lleva a cabo por inmersión sucesiva en alcohol absoluto, alcohol de 96°, 90°, 80°, 70°, 50° y por último en medio de cultivo o soluciones salinas equilibradas.

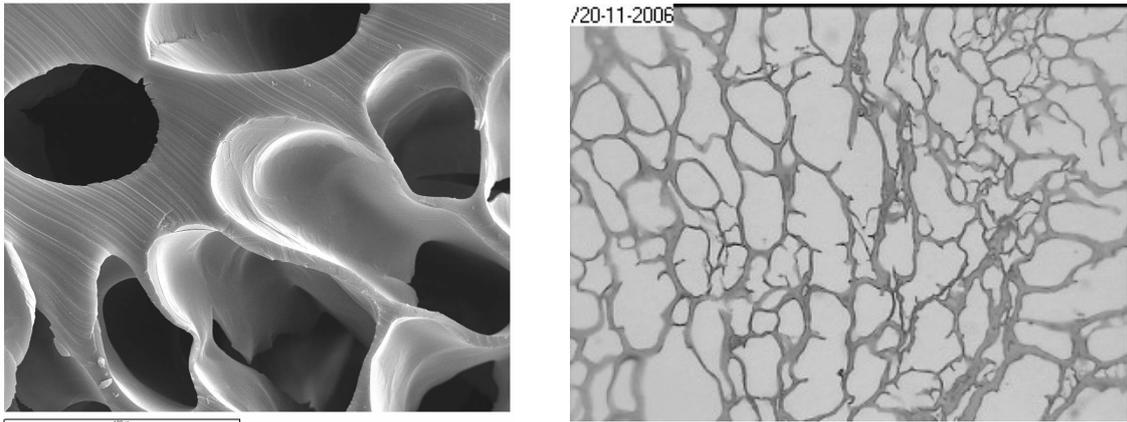


FIG. 1

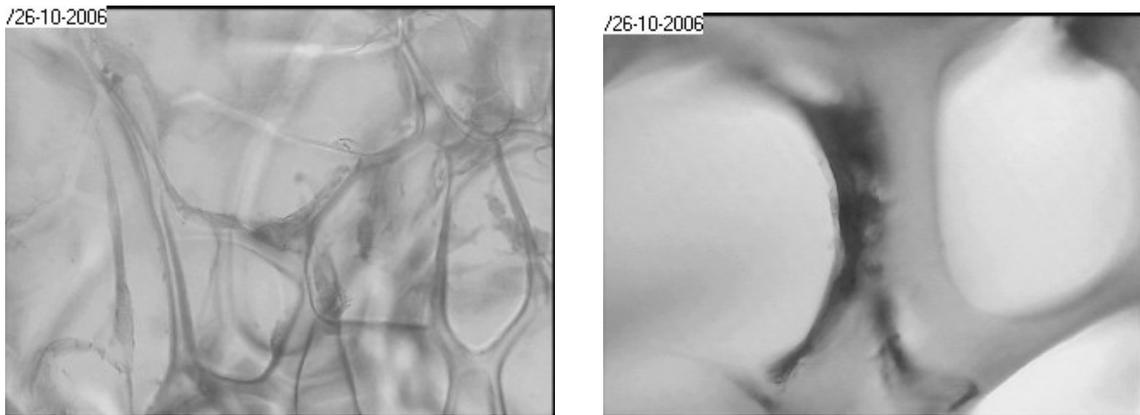


FIG. 2

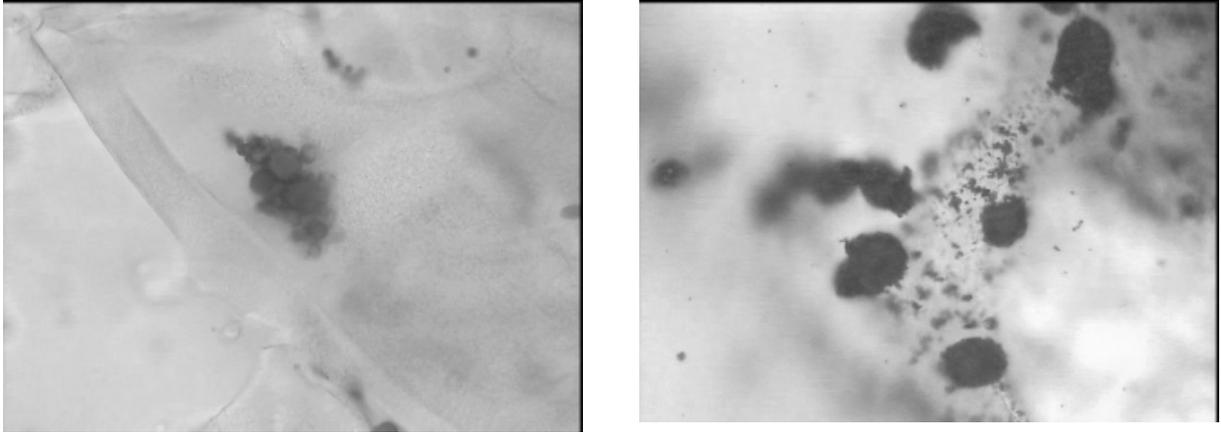


FIG. 3

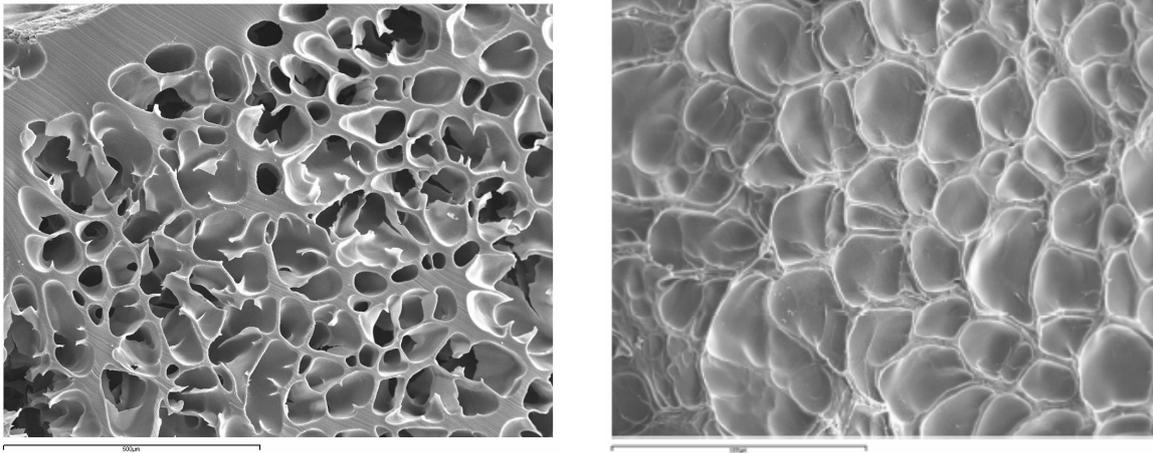


FIG. 4

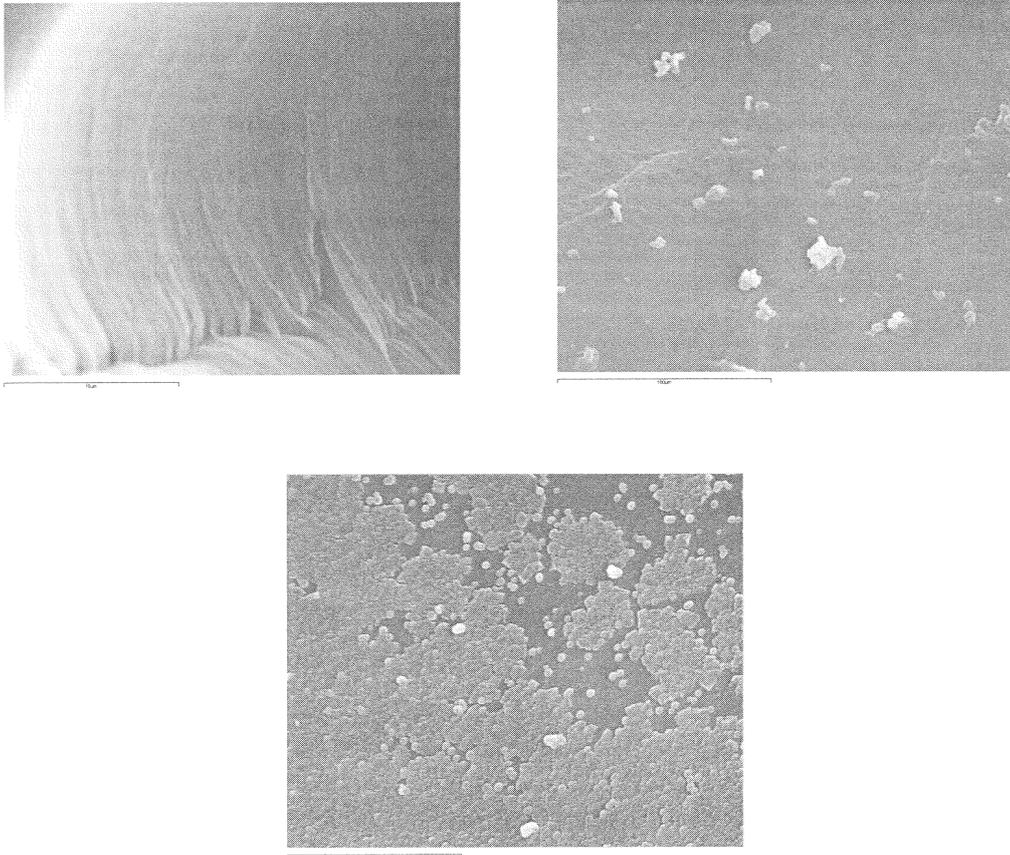


FIG. 5

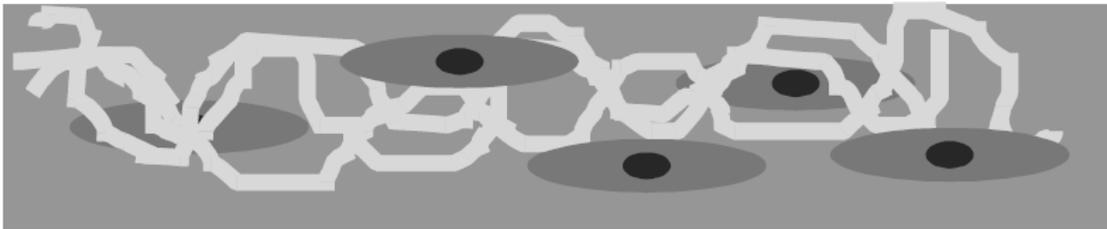


FIG. 6

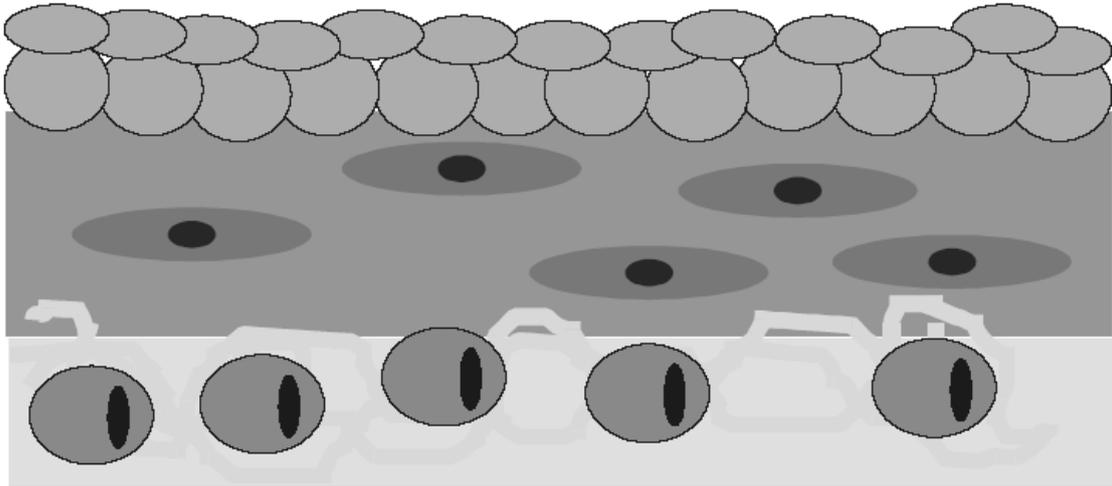


FIG. 7