

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



Т3

1 Número de publicación: **2 580 804**

51 Int. CI.:	
A61F 2/28	(2006.01)
A61F 2/30	(2006.01)
C12M 1/00	(2006.01)
C12M 3/00	(2006.01)
C12M 1/12	(2006.01)

12	TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA			
96 Fecha de presentación y número	de la solicitud europea:	03.03.2010	E 10749299 (3)	
(97) Fecha y número de publicación d	e la concesión europea:	11.05.2016	EP 2408401	

54 Título: Métodos, dispositivos y sistemas para ingeniería de tejido óseo utilizando un biorreactor

(30) Prioridad:	Titular/es:
09.10.2009 US 249999 P 03.03.2009 US 157019 P 09.10.2009 US 250166 P (45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente: 26.08.2016	THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK (100.0%) 412 Low Memorial Library 535 West 116th Street Mail Code 4308
	New York, NY 10027, US (72) Inventor/es:
	VUNJAK-NOVAKOVIC, GORDANA; GRAYSON, WARREN L. y YEAGER, KEITH
	(74) Agente/Representante:
	LAZCANO GAINZA, Jesús
	•

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

Métodos, dispositivos y sistemas para ingeniería de tejido óseo utilizando un biorreactor

Campo

La presente divulgación se relaciona en general a ingeniería de tejidos y, especialmente a métodos, dispositivos y 5 sistemas para ingeniería de tejido óseo.

Antecedentes

La reconstrucción de tejido óseo involucra con frecuencia el injerto de tejido autólogo. Procedimiento en el cual, el hueso de una parte del paciente se usa para reemplazar hueso perdido o dañado en otra parte del paciente. Dado que el injerto de hueso se toma del propio cuerpo del paciente, hay un riesgo reducido de que el cuerpo del paciente rechace el injerto: sin embargo, el tejido autólogo puede estar limitado a dificultades en la recolección, morbilidad del sitio del donante, y/o capacidad del médico para contornear formas tridimensionales delicadas.

El documento US 2008/0113426 A1 divulga un reactor de perfusión para la ingeniería de tejidos apto para preparar implantes óseos. Un andamio dentro de un tubo de membrana y se expone a la perfusión a través de puertos conectados al tubo.

15 El documento US 6,632,651 B1 divulga el sistema de perfusión para el mantenimiento de tejido viable que consta de una cámara que contiene un andamio de una forma deseada la cual es impregnada con células y una bomba que modela y regula el flujo del fluido.

El documento EP 1359214 A1 divulga un reactor de perfusión para ingeniería de tejidos con andamios para mantener y cultivar células. El líquido de perfusión se extrae de puntos de salida conectados a cada andamio.

20 Sumario

10

La disponibilidad de injertos óseos personalizados diseñados a partir de las propias células madre de un paciente puede revolucionar la forma en la que los defectos óseos son tratados actualmente. Un enfoque "biomimético" usa células madre, factores reguladores y andamios apropiados para guiar la diferenciación celular y agruparlas en el fenotipo de tejido deseado: así, un injerto de hueso humano anatómicamente conformado, puede cultivarse ex vivo

- 25 usando un biorreactor capaz de perfundir grandes andamios porosos complejos. Los andamios se derivan de modelos basados en imágenes de un molde que se siembra y cultiva con células madre mesenquimales humanas. El biorreactor rodea el andamio y controla el flujo para la perfusión de las células. Un crecimiento celular denso y uniforme se obtiene a través del constructo como resultado de la perfusión del medio. El biorreactor puede tener un molde en el cual el medio de perfusión es empujado bajo presión, y puertos en múltiples sitios a través de los cuales
- 30 el medio puede entrar y/o salir del molde.

De acuerdo con la reivindicación 1, el método de hacer un injerto óseo incluye moldear un andamio de acuerdo con la forma del molde óseo que se va a reemplazar, formando un soporte con una cavidad que se ajusta estrechamente al andamio dando como resultado la forma, y bombeando el líquido de perfusión dentro de la cavidad mientras simultáneamente recibe el líquido a través de los puertos sellados en múltiples puntos hacia y alrededor del andamio. Los múltiples puntos pueden ser separados y dispuestos de tal manera que el líquido de perfusión entra en

35 el andamio sobre una superficie sustancial de la misma y sale del andamio a los múltiples puntos.

Un injerto óseo puede incluir un andamio con células. Las células pueden organizarse de tal manera que tienen un patrón de densidad que es sensible a un patrón de flujo de líquido de perfusión a través del andamio. El patrón de flujo puede incluir un gradiente de disminución de la densidad de células derivadas de focos en la superficie del andamio.

40

45

Un método de fabricación de una estructura de tejido puede incluir la formación de una imagen de una estructura del tejido diana, formando un andamio tridimensional en respuesta a la imagen y sembrando el andamio con células. El método puede incluir también la entrega de nutrientes a las células dentro y en la superficie del andamio a través de un fluido de nutrientes dentro de un recipiente herméticamente formado que sostiene el andamio, mediante una primera porción de la superficie del andamio, y hacia fuera a través de al menos una segunda porción de la superficie.

Un sistema de ingeniería de tejidos puede incluir un dispositivo mecanizado, un biorreactor y un mecanismo de fluido. El dispositivo mecanizado puede configurarse en un recipiente tridimensional con una superficie interna que adopta la forma de una anatomía especifica del paciente. El biorreactor tiene un receso para recibir dichos recipientes y puertos de salida configurados para aceptar al menos un lumen y permitir la comunicación de flujo

50

entre al menos un lumen y el volumen interno definido por la superficie interna de dicho recipiente. El mecanismo de fluido se configura para remover el líquido de perfusión desde al menos un lumen y regresarlo hacia el interior del recipiente.

Un método para fabricar una estructura de tejido óseo incluye la siembra de un andamio poroso con células madre 5 mesenquimales, y la perfusión de un medio de cultivo a través del volumen intersticial del andamio poroso por un periodo de tiempo tal que las células madre mesenquimales desarrollan laminillas de tejido óseo el cual llena los espacios porosos del andamio.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A-1B son imágenes de una mandíbula humana mostrando la localización del cóndilo de la articulación temporomandibular con respecto a la misma.

La Figura 1C es una imagen de un andamio descelularizado conforme a una o más realizaciones de la materia en cuestión.

La Figura 1D es una imagen de un biorreactor ensamblado conforme a una o más realizaciones de la materia en cuestión.

15 La Figura 1E es un diagrama esquemático que muestra el biorreactor con el andamio en su interior conforme a una o más realizaciones de la materia en cuestión.

La Figura 1F es una visión lateral del modelo tridimensional de un biorreactor con un andamio en su interior, conforme a una o más realizaciones de la materia en cuestión.

Las Figuras 1G a 1J muestran diversas etapas en el ensamble de un biorreactor, conforme a una o más realizaciones de la materia en cuestión.

Figura 1K es un diagrama esquemático de un aparato para el soporte de perfusión de un birreactor, conforme a una o más realizaciones de la materia en cuestión.

La Figura 2 es una tabla que muestra el conteo de cultivo celular bajo diferentes condiciones, conforme a una o más realizaciones de la materia en cuestión.

25 Las Figuras 3A a 3H son imágenes de ejemplares óseos formados bajo diferentes condiciones, conforme a una o más realizaciones de la materia en cuestión.

Las Figuras 4A a 4C son imágenes de un andamio óseo ilustrando cambios en el andamio debido a la perfusión sobre el tiempo, conforme a una o más realizaciones de la materia en cuestión.

La Figura 5A-5B muestra modelos del fluido del líquido de perfusión en el andamio del biorreactor, conforme a una o 30 más realizaciones de la materia en cuestión.

Las Figuras 5C a 5F son imágenes que muestran características de injertos cultivados, conforme a una o más realizaciones de la materia en cuestión.

La Figura 6A es una imagen que muestra una tinción de von Kossa de cortes histológicos de sedimentos cultivados bajo condiciones osteogénicas, conforme a una o más realizaciones de la materia en cuestión.

35 La Figura 6B es una tabla que muestra el contenido de calcio estandarizado a los valores de ADN de sedimentos de células cultivadas durante cuatro semanas en medio osteogénico (ost), condrogénico (ch) o medio control (ctr).

La Figura 6C es una imagen que muestra una tinción con azul alcian e de sedimentos celulares cultivados bajo condiciones condrogénicas.

La Figura 6D es una imagen que muestra una tinción de rojo aceite 0 de gotitas de lípidos en sedimentos cultivados 40 bajo condiciones adipogénicas.

La Figura 7A es una imagen de un aparato para rotación de matraces que se usa para sembrar las células en el andamio, conforme a una o más realizaciones de la materia en cuestión.

La Figura 7B es una imagen que muestra la tinción de hematoxilina-eosina de andamios un día después de la siembra

Las Figuras 8A a 8D son imágenes que muestran los efectos de la velocidad del flujo de perfusión en la densidad celular, conforme a una o más realizaciones de la materia en cuestión.

5 Descripción detallada

10

45

presente descripción.

La disponibilidad de injertos óseos personalizados diseñados a partir de las propias células madre del paciente tiene el potencial de alterar la forma en la que los defectos óseos son tratados actualmente. Los injertos óseos con un alto grado de fidelidad a la forma pueden ser producidos, lo cual tiene un bajo riesgo de rechazo por el cuerpo del paciente. La funcionalidad de la ingeniería de injertos óseos se puede evaluar por las propiedades mecánicas y la capacidad de las células para hacer la proteína especifica de tejido. Los injertos óseos craneofaciales también tienen la característica de que su funcionalidad está ligada a su geometría global.

Los injertos óseos de gran utilidad para cirugía reconstructiva pueden basarse en "andamios de diseño" formados en geometrías gruesas específicas para el paciente y el defecto a ser tratado. Los injertos de hueso humano viables, anatómicamente conformadas pueden ser diseñados usando células madre humanas mesenquimales (hMSCs) y un

- 15 sistema biorreactor "biomimético" de andamios. Las técnicas descritas se pueden utilizar para diseñar estructuras de tejido tales como injertos óseos, incluyendo pero no limitado a autoinjertos. Las células madre humanas mesenquimales son adecuadas para el uso en aplicaciones craneales y maxilofaciales debido a su fácil accesibilidad, capacidad para proliferación in vitro, y el potencial de formar cartílago, hueso, tejido adiposo y tejido vascular.
- 20 El potencial de las células madre mesenquimales para su potencial diferenciación hacia linajes mesenquimales se caracteriza por cada grupo de células por sedimentos de cultivo celular bajo condiciones osteogénicas, condrogénicas y adipogénicas para un cultivo por periodo de tiempo, por ejemplo, durante cuatro semanas. La figura 6A muestra una tinción de von Kossa de un corte histopatológico de células madre humanas mesenquimales cultivadas bajo condiciones osteogénicas. La figura 6B es un gráfico ilustrando el contenido de calcio de las células
- 25 madre humanas mesenquimales cultivadas durante cuatro semanas en medio osteogénico (ost), condrogénico (ch) o medio control (ctr). Los datos en la figura 6B se han estandarizado con respecto a los valores de ADN. La figura 6C representa una tinción con azul alcian de células madre humanas mesenquimales cultivadas bajo condiciones condrogénicas, mientras que la figura 6D es una imagen de una tinción con rojo aceite 0 de gotitas de líquido de células madre humanas mesenquimales cultivadas bajo condiciones adipogénicas. De esta forma, las células madre
- 30 humanas mesenquimales se han pre diferenciado según linajes condrogénicos y osteogénicos. Por otra parte, las células madre humanas mesenquimales pueden formar distintas regiones óseas y cartilaginosas. Sin embargo, otros tipos de células madre también se pueden usar de acuerdo con una o más realizaciones contempladas.

El control in vitro de la viabilidad celular y desarrollo del tejido en la construcción de tejido óseo clínicamente de tamaño y forma determina su utilidad para la medicina regenerativa. La mejora del transporte colectivo y la generación de cizallamiento hidrodinámico, es importante para el desarrollo y funcionamiento óseo, lo que puede requerir flujo intersticial. De esta forma, se describe en este documento los dispositivos de ingeniería de tejidos, sistemas y métodos para la creación in vitro de un cóndilo óseo completo que contiene células viables de una densidad fisiológica y una matriz ósea bien desarrolladas. En las realizaciones, las células madre humanas mesenquimales pueden inducir la formación de hueso en un andamio descelularizado que tiene la geometría exacta
de la estructura ósea deseada. Por ejemplo, la estructura ósea deseada puede ser el cóndilo de la articulación temporomandibular (TMJ), como se señala en las figuras 1A-1B.

Las células madre humanas mesenquimales pueden inducir la formación ósea en el andamio usando un biorreactor "anatómico" con control del flujo intersticial. Los patrones de flujo asociados con la geometría compleja del tejido óseo proporcionan una oportunidad única de correlacionar la arquitectura del hueso formado con las características del flujo intersticial, bajo condiciones in vitro controlables. Este enfoque puede ayudar a proporcionar una variedad de injertos óseos formados anatómicamente diseñados para reunir las necesidades de un paciente determinado y una reconstrucción ortopédica o craneofacial especifica. Otras aplicaciones serán también evidentes a partir de la

- Los andamios anatómicamente formados pueden generarse por hueso CNC mecanizado completamente descelularizado (por ejemplo, trabecular) basado en imágenes digitalizadas de la estructura ósea deseada. Por ejemplo, el hueso trabecular puede derivarse de la región subcondral de la articulación de la rodilla de un ternero y posteriormente tratado para remover cualquier material celular. El hueso puede ser lavado con agua a alta velocidad para remover la medula y después sometido a lavado durante una hora en solución salina amortiguada por fosfatos (PBS) con 0,1% de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (p/v) a temperatura ambiente. El hueso puede ser sujeto entonces a lavados secuenciales en solución isotónica (Tris10mM, EDTA al 0.1% (p/v)) durante la noche a 4°C,
- detergente (Tris10mM, Dodecilsulfato sódico (SDS) al 0.5% (p/v)) por 24 horas a temperatura ambiente, y solución enzimática (50 U/ml de ADNsa, 1U/ml de ARNsa, Tris 10 mM) por 3 a 6 horas a 37°C para eliminar cualquier

material celular restante. Alternativamente se pueden usar, otros tipos de materiales de andamios. Por ejemplo, el andamio puede estar formado de otro material de origen natural tal como coral, material sintético como cerámica o polímero, y/u otras estructuras porosas naturales o sintéticas.

- El hueso trabecular descelularizado puede sembrarse con células madre humanas mesenquimales y cultivarse con flujo intersticial de un medio de cultivo. Un biorreactor con una cámara interna en la forma exacta del hueso humano deseado (por ejemplo, una articulación temporomandibular humana) controla la perfusión a lo largo de la ingeniería del andamio. Después del periodo de cultivación (por ejemplo, 5 semanas), en el tejido de crecimiento puede evidenciarse, por la formación de las capas confluentes del hueso laminar (por microscopía de barrido electrónico), un marcado aumento del volumen de la matriz mineralizada (por tomografía cuantitativa microcomputarizada), y la formación de osteoides (histológicamente). Los experimentos han demostrado que las células en una construcción de este tipo son completamente viables a una densidad fisiológica, lo cual es una propiedad deseable en injertos.
- de este tipo son completamente viables a una densidad fisiológica, lo cual es una propiedad deseable en injertos. Además, la densidad y arquitectura de la matriz ósea se correlaciona con la intensidad y el patrón del flujo intersticial, como se determinó en estudios con modelos experimentales.
- La forma anatómica de una estructura ósea, por ejemplo la articulación temporomandibular de un paciente se puede definir a partir de imágenes médicas digitalizadas, así como las porciones señaladas en las figuras 1A-1B. La articulación temporomandibular tiene una importancia clínica y una forma compleja, lo cual puede ser conveniente para evaluar y demostrar las técnicas de ingeniería y dispositivos descritos en el presente documento. Sin embargo, las técnicas y dispositivos descritos en el presente documento son igualmente aplicables a otros tipos de huesos y formas. La forma de la estructura ósea puede reproducirse fielmente por la construcción de un andamio óseo
- 20 trabecular descelularizado. Por ejemplo, el andamio se puede preparar moliendo el hueso descelularizado con base en imágenes del paciente de tomografía computarizada clínica (CT) representando la geometría exacta del cóndilo humano de la articulación temporomandibular. Un ejemplo de dicho andamio molido para un cóndilo de la articulación temporomandibular se muestra en la figura 1C. Los datos de tomografías computarizadas pueden alimentar un dispositivo computarizado con el fin de crear un andamio apropiadamente formado de hueso trabecular
- 25 totalmente descelularizado. Aunque la forma de un cóndilo de la articulación temporomandibular se ha mostrado y discutido para el andamio, por supuesto, hay otras formas posibles, dependiente del injerto óseo deseado.

Las células madre humanas mesenquimales se pueden cultivar hasta la tercera replicación y luego ser usadas para la siembra de andamios. Después de sembrados, los andamios pueden cultivarse con un medio osteogénico, así como el medio esencial mínimo de Dulbecco (DMEM) complementado con 10% de suero bovino fetal (FBS), 1%

30 penicilina-estreptomicina, dexametasona100 nM, beta-glicerofosfato 10 mM y ácido ascórbico-2-fosfato 50 mM. El andamio mecanizado puede ser sembrado en una suspensión agitada de células madre humanas mesenquimales, por ejemplo, a una densidad de 10⁶ células/ml. El andamio puede entonces ser precultivado estáticamente por un periodo adicional de tiempo, por ejemplo, 1 semana, para permitir la unión celular. Los andamios de células sembradas pueden ser transferidos a las cámaras de los biorreactores anatómicos y se aplica el cizallamiento hidrodinámico iniciando la perfusión del medio. La perfusión usando el biorreactor puede realizarse en un periodo adicional de tiempo, por ejemplo, por 4 semanas.

Las figuras 1D a 1F muestran el sistema biorreactor de perfusión de acuerdo con los modelos del presente documento. El sistema biorreactor de perfusión es diseñado para controlar la vía de perfusión a través de un andamio 100 geométricamente complejo. Un molde 102 anatómicamente formado sostiene el andamio 100. Debido su diseño modular, las cámaras del biorreactor pueden adoptar diferentes geometrías simplemente insertando un molde 102 diferente de forma apropiada, creado, por ejemplo, mediante el uso de imágenes médicas digitalizadas. Adicionalmente, el biorreactor puede hacerse de materiales que permiten la visualización no invasiva y el seguimiento de la distribución del medio dentro de los andamios de tejido a lo largo del periodo de cultivación.

40

El interior del biorreactor es diseñado para ajustarse a la superficie del andamio. Por ejemplo, el interior del biorreactor puede formarse usando un molde de polidimetilsiloxano (PDMS). El molde de polidimetilsiloxano puede ser creado al trasvasar PDMS alrededor de una pieza molida de CNC de delrin (copolímero de acetal) generado a partir de las imágenes digitales a fin de duplicar la forma del andamio óseo 100. Una vez el molde de PDMS se haya endurecido, el delrin es eliminado. El andamio 100 se puede colocar en el molde PDMS 102 e insertarse en el biorreactor. El molde PDMS 102 forma una cavidad interior entre la cámara 108 interior para sujetar el andamio 100 dentro de esta. Aunque se ha descrito el molde de PDMS, hay otros materiales y técnicas que pueden ser utilizadas para producir la cavidad interior que alberga el andamio dentro del biorreactor.

Un sistema que provee un software para la generación de instrucciones de máquina para la fabricación del andamio y/o el dispositivo de soporte (en los ejemplos, corresponde al molde 102) puede también ser proporcionado. El software puede tomar imágenes de la anatomía diana y producir instrucciones para la elaboración del dispositivo de soporte o recipiente de manera que tenga paredes como las descritas con respecto al molde 102 en cuestión. El sistema también puede estar provisto de un dispositivo de fresado para fabricar una estructura positiva para crear el molde o una estructura negativa para el molde como tal. Otros tipos de "elaboración" son también posibles, tal como pero no limitado a impresión 3D o los sistemas rápidos de prototipado/fabricación (por ejemplo, dispositivo de foto polimerización guiado por computador).

Las figuras 1G a 1J muestran los pasos para el montaje del biorreactor ejemplar. Un andamio óseo 100 es ensamblado con el molde 102 y ubicado dentro de la carcasa de cámara 108 interior del biorreactor. La carcasa de cámara 108 interior puede estar hecha, de por ejemplo, polipropileno o polistireno. Una varilla de metal 106 se coloca a través de los agujeros preformados en el molde 102 y la carcasa de cámara 108 interior, a fin de alinear el conjunto con una ranura 110 en la cámara 112 exterior. La cámara 112 exterior puede ser hecha, por ejemplo de acrílico transparente. Por ejemplo, la cámara exterior del biorreactor puede tener un diámetro externo de 7.5 cm y

una altura de 5 cm. Sin embargo, otros materiales y tamaños adecuados también se pueden usar para el biorreactor de acuerdo con uno o más realizaciones contempladas. En virtud de la alineación proporcionada por la varilla 106, el ensamble y el andamio dentro de este pueden mantenerse en la orientación correcta, como se muestra en la figura
 11. El ensamble del andamio 100, molde 102 y carcasa de cámara 108 interior insertada en la cámara 112 exterior,

5

- que son entonces tapadas herméticamente con una tapa 114. La tapa 114 puede estar hecha, por ejemplo, de polieterimida (PEI). La tapa 114 también puede tener una ranura en la misma para acomodar la varilla 106 cuando se sellen la cámara 108 interior y cámara 112 exterior.
- La cámara 112 exterior y tapa 114 sirven también para comprimir el molde 102 alrededor del andamio 100, forzando de este modo que el medio de cultivo fluya a través de todo el andamio, en lugar de la canalización de la periferia alrededor de la misma. La cámara 112 exterior puede tener una pluralidad de puertos cilíndricos radiales, por ejemplo, los orificios 104. Por ejemplo, la cámara 112 exterior puede tener seis puertos dispuestos equidistantemente alrededor de la circunferencia de la cámara exterior (por ejemplo, a intervalos de 60°). Cada uno de los puertos cilíndricos pueden servir como guía para el control de la posición exacta y profundidad para la
- 20 inserción de una aguja 116 dentro del andamio 100, cuyo propósito es discutido en mayor detalle a continuación. Por ejemplo, la aguja 116 puede ser una aguja de calibre 23. Ajustando anillos de delrin que pueden ser colocados en cada orificio 104. El centro de los anillos de delrin puede ser aprovechado para acomodar tornillos de nylon que han sido nucleados para adaptarse a las agujas de calibre 23 dentro del mismo. Las agujas son ubicadas dentro de los tornillos de nylon de tal manera que los extremos de las agujas sobresalen de los tornillos. Cuando se atornillan dentro de los anillos delrin, el conjunto de tornillos de nylon permite que la aguja penetre el andamio en la cámara interior para servir como un puerto de entrada/salida para el flujo del medio.
 - Uno o más puertos de salida pueden ser proporcionados en y alrededor del andamio para distribuir uniformemente el fluido a través del mismo y permitir la perfusión completa de las áreas intersticiales del andamio. Tales puertos de salida son más pequeños que los puertos de entrada.
- 30 La ubicación de cada orificio 104 está determinada, por ejemplo, por el uso del diseño asistido por un computador basado en una reconstrucción tridimensional de la estructura ósea deseada. En los modelos, tres de los seis puertos 104 pueden ser usados como salidas. Un puerto adicional, alineado con el eje central de la cámara interna 108, puede ser conectado al tubo 122 mediante un conector 118 (por ejemplo, un conector de luer). Este puerto central sirve como una única entrada para el medio a introducir en el andamio 100. De esta forma, el flujo entra por el tubo 122 a la cámara interna 108, perfunde a través del andamio 100, y sale a través de tres (o más) agujas de salida
- 116. El tubo 120 conectado a las agujas de salida 116 pueden transportar el líquido perfundido desde este. La velocidad de flujo del medio saliendo a través de los puertos de salida 104 por el tubo 120 puede ser regulada de
- tal manera que la velocidad de flujo para cada salida es igual. Tal regulación puede lograrse, por ejemplo al ajustar las abrazaderas en el tubo 120. Alternativamente, los reguladores de flujo en línea o válvulas pueden ser usadas
 para controlar la velocidad de flujo de cada salida. Además, la velocidad de flujo para cada salida no tiene que ser igual. más bien la velocidad de flujo puede ser controlado para lograr un perfil de flujo deseado propicio para el crecimiento celular determinado a partir del modelado y/o experimentación de flujo asistido por computador.
- Como se muestra en la figura 1K, el medio de cultivo perfundido través del biorreactor 1004 puede ser regresado por la bomba 1010 al depósito 1002 para su reutilización. El depósito 1002 puede también servir como una trampa de burbujas con una salida de aire 1008. La bomba 1010, puede ser por ejemplo, una bomba peristáltica digital multicanal de bajo flujo, que puede recircular el medio de cultivo desde el depósito 1002 al biorreactor. El medio en el reservorio 1002 puede ser cambiado periódicamente a través del puerto 1006 del depósito. Por ejemplo, una jeringa puede conectarse al puerto 1006 para eliminar estérilmente el medio de cultivo y agregar medio de cultivo al depósito sin perturbar la operación del biorreactor 1004. El depósito puede contener un volumen inicial de, por ejemplo, 40 ml de medio de cultivo. La mitad del medio de cultivo en el depósito puede ser reemplazada, por ejemplo, cada tres días.

La ingeniería de tejidos de la construcción de grandes huesos requiere flujo a través del intersticio y/o poros del andamio para un transporte eficiente de nutrientes y de material de desecho entre las células y el medio de cultivo. Adicionalmente, el flujo intersticial permite una exposición directa de células al cizallamiento hidrodinámico lo cual puede ser importante para la osteogénesis. La velocidad de flujo volumétrica (por ejemplo 1,8 ml/min) y la correspondiente velocidad superficial (por ejemplo un promedio de 0,06 cm/s) pueden ser seleccionadas para sostener el crecimiento de tejido denso a lo largo del andamio. Por ejemplo, las tasas de flujo pueden ser seleccionadas con el fin de estar dentro de la gama de índices de flujo y velocidades superficiales que estimulan la diferenciación osteogénica de las de las células madre humanas mesenquimales.

Las células pueden ser cultivadas en un andamio que tiene las propiedades estructurales, bioquímicas y mecánicas del hueso original y la geometría real del injerto final. Por ejemplo, el andamio puede estar formado de hueso completamente descelularizado, el cual ha sido elaborado, por ejemplo por la fabricación guiada por imagen, para lograr la geometría deseada del injerto final. El volumen de vacío de dicho hueso descelularizado fue determinado

- 5 por un análisis de micro-CT, el cual es mayor del 80%. Los análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM) e histológicos del hueso descelularizado también revelan tamaños de los poros de aproximadamente 1 mm. Dichas características estructurales permiten la siembra dinámica eficiente y espacialmente uniforme de las células madre humanas mesenquimales en los andamios. la evaluación histológica de los andamios recién sembrados demostró que las hMSCs alinean las paredes porosas internas, mientras dejan espacios porosos despejados. En referencia a
- 10 la figura 7A, un matraz de spinner (la tapa muestra elaboraciones de la articulación temporomandibular) puede ser usada para sembrar células en los andamios de una articulación temporomandibular. La figura 7B muestra una tinción de hematoxicilina-eosina (H&E) de un andamio un día después de sembrado. Como es evidente en la figura 7B los espacios porosos en el andamio permanecen abiertos, y las células pueden encontrarse solo a lo largo de las paredes de los poros (véase las flechas en la figura 7B). La figura 7C muestra una tinción via/muerta de un andamio
- 15 un día después de sembrado. Como es evidente en la figura 7C, un alto porcentaje de células viables se puede mantener durante todo el proceso de siembra.

20

Después de una hora, se encontró que la eficiencia de la siembra fue de $34,0 \pm 7,1\%$ dando como resultado aproximadamente $3,4 \times 10^6$ células por construcción, fijadas de una manera espacialmente uniforme. Los andamios se cultivaron estáticamente por una semana antes de su colocación en los biorreactores, permitiendo la unión celular firme y deposición de la matriz extracelular antes de la exposición a fuerzas hidrodinámicas de cizalladura. Por supuesto, otros métodos y dispositivos para la siembra de andamios son contemplados.

Después de sembrado, el andamio puede ser ensamblado en condiciones estériles en el biorreactor, como se discute al respecto en las figuras 1G a 1J. El rápido montaje puede mantener la viabilidad celular en el andamio durante el proceso. Usando el biorreactor, el medio de cultivo puede ser perfundido a lo largo de todo el andamio.

- Para una determinada velocidad de flujo, la velocidad de flujo de salida se mantiene igual en cada una de las tres salidas, aunque las tasas de flujo diferenciales son también posibles. La velocidad óptima de flujo de entrada puede ser determinada basándose en el análisis de flujo de fluido, el modelado asistido por computador para los datos experimentales. Por ejemplo, la velocidad de flujo de entrada puede estar entre 0,4 ml/min y 1,8 ml/min. La evaluación experimental de la densidad y distribución celular después de 5 semanas de cultivado sugiere que 1.8
- 30 ml/min pueden producir la mejor distribución celular y el más rápido desarrollo de tejido para el biorreactor descrito. Basado en análisis de micro-CT el promedio del área del corte transversal a través de los andamios en la dirección de flujo se determinó que era 0,5 cm². Para esta área del corte transversal, la velocidad de flujo de entrada de 1,8 ml/min corresponde a un promedio de la velocidad de flujo superficial de 0,06 cm/s. Sin embargo, otras tasas de flujo y/o velocidades de flujo superficiales pueden elegirse dependiendo de, por ejemplo, la geometría del biorreactor, el tipo de célula madre, el tamaño del andamio, el tipo de andamio, y/o tamaño de los poros.
- Debido a la compleja distribución del flujo dentro de los andamios de tejido, las tasas de flujo tan altas como 0,15 cm/s son posibles en ciertas regiones del andamio, y tan bajas como 0,0001 cm/s en otras regiones del andamio. En todo el intervalo de estas velocidades de flujo, las hMSCs pueden mantener completamente la viabilidad y exhibir las
- características de diferenciación osteogénica. Tampoco hay ningún umbral aparente en la velocidad de flujo del
 fluido en el que la perfusión se vuelve perjudicial por las hMSCs. Por lo tanto, es posible que el crecimiento del tejido pueda ser mejorado mediante el aumento de las tasas de flujo en el biorreactor por encima de la velocidad de flujo de entrada de 1,8 ml/min descrita anteriormente.
- Las densidades celulares finales fueron aproximadamente 105 210 x 106 células/ml. Tales altas densidades de células pueden ser importantes para la formación funcional de tejido óseo para la interacción célula-célula. Para los modelos estáticamente cultivados, el pobre empaquetamiento de las células (indicado por SEM) y sólo mínima formación osteoide (indicado por histología) proporcionaron evidencia de diferenciación funcional limitada de las hMSCs en las regiones interiores de estas realizaciones. Para los modelos de biorreactores cultivados, diversas modalidades de imagen, discutidas a continuación, confirmaron que las células forman tejidos densos a través de los volúmenes de constructo, llevando a un mayor incremento en el volumen del hueso.
- 50 Con referencia a las figuras 8A a 8D, muestran los efectos del flujo de perfusión en la densidad celular en el andamio. Las figuras 8A a 8D son tinciones de H&E de las regiones centrales del andamio cultivado durante 5 semanas bajo diferentes condiciones de flujo. En la figura 8A fue cultivada fue cultivado bajo condición estática (por ejemplo, no flujo). En la figura 8B fue cultivado bajo una velocidad de flujo de entrada de 0,4 ml/min. En la figura 8C fue cultivado bajo una velocidad de flujo de entrada de 0,4 ml/min. En la figura 8C fue cultivado bajo una velocidad de flujo de entrada de 1,8 ml/min. Como se evidencia en las figuras 8A a 8D, el aumento en la velocidad de flujo lleva al depósito cada vez más denso de la matriz en los espacios porosos.

A través de la perfusión del andamio de la manera descrita mediante el biorreactor, las células son capaces de proliferar en el andamio, con el fin de formar un injerto óseo viable. En los experimentos, las células proliferan extensivamente durante la primera semana de cultivo, como se evidencio en aproximadamente un aumento de 7,5

veces en el contenido de ADN. El contenido de ADN continuo aumentando en todo el periodo de cultivo bajo ambas condiciones de cultivo, tanto en la estática (4,5 veces más) como en la perfundida (10 veces más), lo que resulta en general 37 y 35 veces más, respectivamente, en el número de las células en relación con sus valores de siembra iniciales. Con referencia ahora a la figura 2, el número de células aumentó con el tiempo de cultivo y perfusión del

- 5 medio. Desde el día 1 al dia7, el número de células aumento 7,5 veces, de 3,4 x 10⁶ a 25 x 10⁶ células/andamio. Sobre las siguientes cuatro semanas, el número de células en cultivo estático aumento 4,5 veces, aproximadamente 110 x 10⁶ células/andamio. Mientras que el aumento en el cultivo del biorreactor perfundido fue 10 veces más, aproximadamente 250 x 10⁶ células/andamio.
- Con referencia a las figuras 3A a 3H, la formación de hueso fue marcadamente reforzada por la perfusión en una manera que respondiera al patrón de flujo de fluido. Las figuras 3A A 3D muestran andamios cultivados bajo condiciones estáticas mientras que las figuras 3E a 3H muestran andamios cultivados con medio de perfusión en el biorreactor en cuestión. Las figuras 3A y 3E muestran una tinción con tricrómico de la totalidad de los cortes transversales de los andamios, que muestran las diferencias en la distribución de la nueva matriz comparado con el andamio original para los grupos de cultivo estático (figura 3A) y perfundido (figura 3E). Además, las diferencias significativas se pueden observar en la formación osteoide (flechas) en la región central de los andamios cultivados
- estáticamente (figura 3B) y de perfusión (figura 3F).

Las figuras 3C, 3D, 3G y 3H son imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de las regiones centrales del andamio. En especial, las figuras 3C y 3D muestran que los andamios cultivados estáticamente exhiben espacios porosos vacíos y células pobremente empaquetadas. Por el contrario, las figuras 3G y 3H muestran que los andamios cultivados en perfusión demuestran la formación de láminas densas y confluentes de tejido óseo que

- llenan todo el espacio poroso. Los incrementos medidos en el número de células con el tiempo y régimen de cultivo han sido corroborados con los datos de imágenes. Los andamios cultivados bajo condiciones estáticas forman nueva matriz primaria en la periferia (figura 3A), mientras que los andamios que crecen en el biorreactor muestran un nuevo crecimiento a lo largo de sus volúmenes (figura 3E). Los cortes histológicos demostraron marcado
- 25 contraste en el crecimiento celular y formación de patrón osteoide en las regiones centrales de los dos grupos de cultivo (figura 3B y 3F). La nueva área osteoide estandarizada a hueso trabecular existente en las regiones centrales del andamio estático fue de 0,031 ± 0,013 mm²/mm², comparado con 0,210 ± 0,022 mm²/mm² para los andamios perfundido (por ejemplo un incremento de 7 veces debido a la perfusión). Las imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de las regiones internas de los andamios de tejido corroboran estos hallazgos, sin embargo estos
- 30 fueron singularmente instructivos. Las regiones internas de los andamios estáticos mostraron espacios porosos que estaban vacíos o únicamente empaquetados pobremente con las células y matriz (figuras 3C y 3D), a diferencia de los andamios perfundidos, los cuales mostraron espacios porosos densamente empaquetados a lo largo de todos sus volúmenes (figuras 3G y 3H).
- Las figuras 4A fue tomada en el momento del inicio del proceso de perfusión, la figura 4B en medio del proceso de perfusión, y la figura 4C al finalizar el proceso de perfusión. En particular estas figuras ilustran el desarrollo de la arquitectura de la matriz ósea mineralizada del andamio con el tiempo y de una manera dependiente de las condiciones de cultivo. Así, las imágenes muestran los cambios en la estructura de los poros (en relación con el estado inicial) que fueron evidentes al finalizar el periodo de cultivo de cinco semanas. Los andamios biorreactor muestran una más rápida deposición de la nueva matriz mineral en comparación con los andamios estáticos. La deposición mineral en los espacios porosos se evidencia también en las figuras 4A-4C. Se observó un incremento estadísticamente significativo en el volumen óseo en relación con el tiempo de cultivo en ambos tipos, el andamio estático (8.7%) y el perfundido (111%), con el consiguiente incremento en el número de trabecular (Tb.N*) y el espesor (Tb.Th), y la disminución de la separación trabecular (Tb.Sp*). Los números del índice de modelo estructural (SMI) para los andamios estáticos y perfundidos fueron más bajos después de la cultivación, lo que indica una tendencia hacia la formación de las trabéculas en forma de placa.

El modelado asistido por computador se puede realizar para evaluar el efecto de los parámetros de flujo de perfusión. Un ejemplo de tal modelo de computador para un andamio de la articulación temporomandibular en el biorreactor descrito se muestra en las figuras 5A-5B. En particular, la modelización teórica del flujo en el andamio indica una amplia distribución en la magnitud (0 a 0,15 cm/s) y las direcciones de las velocidades de flujo dentro de

- 50 los modelos. Las velocidades de flujo fueron más altas en las regiones de entrada y salida, adyacentes a los puertos de agujas. Debido a la compleja geometría del andamio, su base plana no está en el centro de la cámara, lo que resulta en gradientes espaciales de la distribución de flujo a través de la base. Las velocidades de flujo más bajas se encontraron en las proyecciones externas derechas e izquierdas de los andamios con el vector de velocidad calculado indicando alrededor de cero en los extremos (figura 5A), ya que la aguja de salida no fue colocada en la
- 55 punta de la proyección. Los estudios mostraron que el medio hace de hecho que se perfundan estas regiones extremas. El análisis histológico de andamios de cinco semanas demostró claramente la supervivencia celular y la producción de la matriz en estas regiones.

Con referencia a las figuras 5A-5F, la morfología de la matriz ósea se ha correlacionado con los patrones del medio de perfusión del flujo. La figura 5A muestra vectores de velocidad codificados por colores indicando la magnitud y dirección del flujo a través del andamio basado en parámetros medidos experimentalmente. La figura 5B esta

60

20

seccionada digitalmente, y los contornos codificados por colores se usan para indicar la magnitud del flujo en las regiones interiores. Las imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) mostraron variaciones morfológicas en la morfología del tejido con la variación en el patrón del flujo del fluido. Por ejemplo, en las regiones del medio donde el flujo del fluido es unidireccional, el tejido parece suave y alineado, y las estructuras cristalinas pueden

5 verse fácilmente en la superficie (figuras 5C-5D). En la base de la proyección cerca al puerto de salida, el modelo indica grandes cambios locales en el vector de velocidad, resultando efectivamente en patrones de flujo remolino. La gran ampliación de las imágenes de microscopía electrónica de barrido de esta zona demostró un remolino correspondiente a la estructura de matriz mineralizada (figura 5E-F).

Por lo tanto, el enfoque descrito en este documento demuestra que es posible crear los injertos de hueso usando un

10 biorreactor que (i) guarda los andamios de tejido formados anatómicamente con geometrías complejas, (ii) proporciona flujo intersticial controlado del medio de cultivo a través de los espacios porosos de los andamios, y (iii) permite el establecimiento de protocolos de cultivo para la ingeniería de injertos de huesos humanos grandes.

Varias operaciones de ingeniería de tejidos se pueden emplear incluyendo, pero no limitándose a (i) fabricación de andamios anatómicos guiados por imagen, (ii) uso de hueso descelularizado como un andamio osteoinductivo, (iii) uso de población de células madre mesenquimales pluripotenciales, aplicables a formas autólogas o alogénicas, (iv)

- 15 uso de población de células madre mesenquimales pluripotenciales, aplicables a formas autólogas o alogénicas, (iv) la perfusión basada en el control del ambiente y la estimulación biofísica de los modelos óseos cultivados, y (v) la optimización del modelado computacional del diseño del biorreactor.
- Un método para la ingeniería de tejido óseo puede incluir por separado o en combinación: (i) la formación de imágenes al menos una parte de un paciente para un injerto óseo deseado, (ii) la realización de un andamio poroso a la forma del injerto óseo deseado, (iii) sembrar el andamio poroso con hMSCs, y (iv) la perfusión del medio de cultivo a lo largo del volumen intersticial del andamio poroso por un periodo de tiempo para que las hMSCs desarrollen láminas de tejido óseo que llenan los espacios porosos del andamio.

Los métodos, sistemas y dispositivos para la ingeniería de tejidos descritos en este documento permiten así la formación de modelos óseos geométricamente complejos de alta fidelidad biológica y estructural. El modelo computacional del flujo de fluido también puede proporcionar pistas importantes sobre la respuesta del tejido a los estímulos biofísicos. Aunque se han discutido configuraciones particulares en el presente documento, pueden emplearse otras configuraciones. Además, la anterior descripción se aplica, en algunos casos, a los ejemplos generados en un laboratorio, pero estos ejemplos pueden extenderse a técnicas de producción. Por ejemplo, cuando las cantidades y técnicas se aplican a ejemplos de laboratorio, estas no deben entenderse como limitantes.

30 Adicionalmente, aunque la producción de injertos de tejido óseo se ha descrito en este documento, las técnicas descritas son aplicables también a otros tejidos.

Reivindicaciones

1. Un método de hacer injertos óseos, que comprende:

moldear el andamio de acuerdo con una forma diana del hueso que va a ser reemplazado;

formar un soporte con una cavidad que se ajuste apretadamente al andamio resultante del moldeado, y

- 5 bombear el líquido de perfusión a la cavidad mientras recibe simultáneamente el líquido de perfusión a través de puertos sellados en múltiples puntos hacia y alrededor del andamio, estando los puntos separados y organizados de manera que el líquido de perfusión entre al andamio sobre una superficie de mismo y salga del andamio en estos puntos.
- 2. El método de la reivindicación 1, en el que el receptor incluye recibir el líquido de perfusión a través de las agujas,
 cada una insertada en el andamio en uno correspondiente de los puntos múltiples.

3. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el líquido de perfusión incluye un nutriente.

4. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el andamio es sembrado con células.

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el bombeo se continua por un periodo de días.

15 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el soporte es de un material transparente.

7. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el soporte está alojado en una cámara transparente.

8. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el moldeado incluye generar imágenes de la forma diana y la elaboración de una palanquilla de andamio en respuesta a los datos que definen una imagen resultante de dicha generación de imágenes.

20

9. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además:

el modelado del flujo del líquido de perfusión a través del andamio, y

la selección de los puntos múltiples en respuesta al resultado de la modelización.











Fig. 1F





Fig. 1K















Fig. 3H















