

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 599 828**

51 Int. Cl.:

**C12M 3/00** (2006.01)

**C12N 5/07** (2010.01)

**A61F 2/02** (2006.01)

**A61L 27/38** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.06.2010 PCT/US2010/037379**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.12.2010 WO10141803**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2010 E 10784139 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.08.2016 EP 2438155**

54 Título: **Pulmón bioartificial**

30 Prioridad:

**04.06.2009 US 184170 P**  
**29.10.2009 US 256281 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**03.02.2017**

73 Titular/es:

**THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION**  
**(100.0%)**  
**55 Fruit Street**  
**Boston, MA 02114, US**

72 Inventor/es:

**OTT, HARALD C.**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

ES 2 599 828 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

Pulmón bioartificial

5 **Campo técnico**

Este documento proporciona un aparato y procedimientos relacionados con la generación de tejido. Por ejemplo, este documento proporciona procedimientos para generar tejido de pulmón trasplantable en un sujeto humano o animal.

10

**Antecedentes**

Los trasplantes de pulmón representan una esperanza final para muchos pacientes que experimentan estados tipificados por insuficiencia pulmonar, por ejemplo, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)EPOC, fibrosis quística, cánceres de pulmón y enfermedades del pulmón congénitas, entre otras. El tipo de espera típico para un trasplante de pulmón puede ser de dos años o más, lo que da como resultado una tasa de mortalidad del 30% para los que están en la lista de espera.

15

El documento WO 02/053193 A2 divulga un dispositivo de múltiples capas para la obtención por ingeniería de tejidos de un órgano vascularizado usando tecnología de ensamblaje de polímero de material microtextil.

20

El documento US 4.446.229 A divulga un sistema *in vitro* que puede soportar el crecimiento de tejido con suministro de sangre, en el que el tejido vivo se injerta sobre un mesenterio no inmunorreactivo.

25

El documento WO 2007/095192 A2 divulga un biorreactor para su uso en la producción de neoórganos, lo que permite un entorno apropiado para el mantenimiento de condiciones de cultivo sanas desde la humectación previa hasta el envío del neoórgano.

30

El documento US 5.750.329 A divulga un sistema de pulmón artificial que comprende una capa de células endoteliales, una capa de células epiteliales alveolares y una membrana microporosa artificial.

El documento US 6.416.995 B1 divulga un dispositivo y un proceso para recelularizar injertos de tejido esencialmente acelulares o desvitalizados derivados de fuentes humanas o animales basándose en la repoblación y reendotelización del injerto de tejido.

35

El documento WO 2010/091188 A1 divulga un tejido de pulmón tridimensional obtenido por ingeniería que presenta características de un tejido de pulmón natural.

**Resumen**

40

La presente invención se define mediante las reivindicaciones independientes 1 y 9 dirigidas a un aparato de biorreactor de órganos de las vías respiratorias y a la provisión de un pulmón bioartificial, respectivamente. Las reivindicaciones dependientes describen modos de realización preferidos de la invención.

45

Se presenta un aparato de biorreactor de órganos de las vías respiratorias. El aparato tiene una cámara de órganos configurada para contener un armazón de matriz de órganos sobre el que se perfunde un medio celular para hacer crecer un órgano. El aparato tiene además un sistema de ventilador húmedo configurado para suministrar una ventilación húmeda al órgano por medio de la primera ramificación del conector. El aparato tiene además un sistema de ventilador seco configurado para suministrar una ventilación seca al órgano por medio de la primera ramificación del conector. El aparato tiene además un controlador configurado para controlar el suministro de ventilación húmeda o el suministro de ventilación seca.

50

El aparato puede comprender además un conector que incluye una primera ramificación, una segunda ramificación, y una tercera ramificación conectadas al órgano. El aparato tiene además una primera unión de tres vías en la que la primera ramificación del conector y la segunda ramificación del conector se conectan a la tercera ramificación del conector. La unión de tres vías que incluye un conmutador puede estar configurada para bascular entre la primera ramificación y la segunda ramificación. El aparato tiene además un sistema de ventilador húmedo configurado para suministrar una ventilación húmeda al órgano por medio de la primera ramificación del conector. El aparato tiene además un sistema de ventilador seco configurado para suministrar una ventilación seca al órgano por medio de la segunda ramificación del conector. El aparato tiene además un controlador configurado para controlar el conmutador de la primera unión de tres vías, controlando de ese modo el suministro de ventilación húmeda o el suministro de ventilación seca.

55

60

El aparato puede comprender además un sistema de depósito configurado para suministrar medio celular al órgano al largo de una línea de entrada; y drenar medio gastado del órgano a lo largo de una línea de salida, incluyendo la línea de salida una primera ramificación, una segunda ramificación y una tercera ramificación; y una segunda unión

65

de tres vías en la que la primera ramificación de la línea de salida y la segunda ramificación de la línea de salida se conectan a la tercera ramificación de la línea de salida. El sistema de ventilador húmedo puede comprender un ventilador húmedo conectado a la cámara de órganos por medio de una línea de ventilación húmeda; y una cámara de distensión conectada al órgano por medio de la primera ramificación del conector. Puede proporcionarse una presión espiratoria positiva húmeda (wPEEP) a la cámara de órganos por medio de una elevación de la cámara de distensión. El aparato puede comprender además una cámara de poscarga conectada a la cámara de órganos por medio de la segunda ramificación de la línea de salida; y al sistema de depósito por medio de una línea de retorno de salida. El sistema de depósito puede comprender un primer depósito conectado a la cámara de órganos por medio de una línea de entrada; y un segundo depósito conectado a la cámara de órganos por medio de un drenaje de cámara de órganos; y a la cámara de poscarga por medio de la línea de retorno de salida, en el que por el primer depósito y el segundo depósito circula medio a lo largo de una línea de alimentación de depósito y un drenaje de depósito. El sistema de ventilador seco puede comprender una cámara de ventilación seca que incluye un nebulizador, conectado al órgano por medio de la segunda ramificación del conector; y un primer ventilador seco configurado para proporcionar una presión espiratoria positiva seca (dPEEP) a la cámara de órganos y conectado a la cámara de ventilación seca por medio de una línea de dPEEP. El sistema de ventilador seco puede comprender además un segundo ventilador seco conectado a la cámara de órganos por medio de una línea de ventilador seco. El aparato puede comprender además un tanque de gas configurado para suministrar medio gaseoso a la cámara de órganos, la cámara de ventilación seca y el sistema de depósito. El controlador puede hacerse funcionar mediante un ordenador.

En otro aspecto, este documento presenta un procedimiento *ex vivo* para proporcionar un órgano de las vías respiratorias bioartificial tal como se define en la reivindicación 9. El procedimiento puede comprender proporcionar una matriz de tejido de pulmón que comprende una matriz de tejido de pulmón y vasculatura sustancial; sembrar la matriz de tejido de pulmón con células; proporcionar al órgano humedad, es decir ventilación de fluido durante un tiempo suficiente para que se produzca un primer grado deseado de maduración del órgano; y proporcionar al órgano maduro húmedo sequedad, es decir ventilación gaseosa durante un tiempo suficiente para que se produzca un segundo grado deseado de maduración del órgano, proporcionando de ese modo un pulmón bioartificial. El procedimiento puede comprender además sembrar la matriz de tejido de pulmón con células endoteliales sobre la vasculatura del órgano; y sembrar la matriz de tejido de pulmón de las vías respiratorias con células epiteliales a lo largo de una vía respiratoria del órgano. El procedimiento puede comprender además sembrar la matriz de tejido de pulmón con células madre a lo largo de una vasculatura del órgano. Las células madre pueden ser células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea o células madre pluripotentes inducidas (iPS). Las células madre pueden suspenderse en un fluido a una concentración de aproximadamente 100 millones de células por 30 cc de fluido. Las células endoteliales pueden suspenderse en un fluido a una concentración de aproximadamente 100 millones de células por 10 cc de fluido. Las células epiteliales pueden suspenderse en un fluido a una concentración de aproximadamente 100 millones de células por 5 cc de fluido. El procedimiento puede comprender además monitorizar el grado de maduración del órgano hasta que se haya producido el primer grado deseado de maduración del órgano; dejar de proporcionar la ventilación húmeda al órgano; aplicar un tensioactivo artificial al órgano; y comenzar a proporcionar la ventilación seca al órgano. Proporcionar a la matriz de tejido de pulmón ventilación húmeda puede comprender conectar la vía respiratoria a un ventilador húmedo por medio de una línea de ventilador húmedo; conectar el órgano a una cámara de distensión por medio de una línea de ventilación húmeda; aumentar la presión de vía respiratoria húmeda a lo largo de la línea de ventilación húmeda; y proporcionar una presión espiratoria positiva húmeda (wPEEP) al órgano elevando la cámara de distensión. La ventilación húmeda se proporciona a un volumen tidal fisiológico. Proporcionar al órgano maduro húmedo ventilación seca puede comprender conectar la vía respiratoria a una cámara de ventilación seca por medio de una línea de ventilación seca; conectar la cámara de ventilación seca a un primer ventilador seco a lo largo de una línea de presión espiratoria positiva seca (dPEEP); aumentar la presión de vía respiratoria seca a lo largo de la línea de ventilación seca; desconectar la línea de ventilación húmeda; y conectar el órgano a un segundo ventilador seco por medio de una línea de ventilador seco. La matriz de tejido de pulmón puede comprender tejido de pulmón humano descelularizado o una matriz de pulmón artificial. El pulmón bioartificial puede comprender un número suficiente de células como para proporcionar una función de pulmón completo o una fracción del mismo.

En otro aspecto, este documento presenta un pulmón bioartificial producido mediante el procedimiento proporcionado en el presente documento. El pulmón bioartificial puede ser un pulmón completo o una parte del mismo.

En un aspecto adicional, este documento presenta un procedimiento de tratamiento de un sujeto que tiene capacidad pulmonar alterada o reducida. El procedimiento puede comprender trasplantar el pulmón bioartificial al sujeto.

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque pueden usarse procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento para poner en práctica la invención, se describen a continuación procedimientos y materiales adecuados. En caso de conflicto, la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones, prevalecerán. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son ilustrativos solo y no se pretende que sean limitativos.

Los detalles de uno o más modos de realización de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y la descripción a continuación. Otras características, objetos y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y a partir de las reivindicaciones.

- 5 **Descripción de los dibujos**
- La fig. 1 es un diagrama esquemático de un biorreactor de pulmón a modo de ejemplo.
- 10 Las figs. 2A, 2B, 2C y 2D son diagramas de flujo de un procedimiento a modo de ejemplo para hacer crecer tejido de pulmón en un biorreactor de pulmón.
- La fig. 3 es un dibujo esquemático de una unidad de descelularización de pulmón a modo de ejemplo.
- 15 La fig. 4 es un dibujo esquemático de un biorreactor de pulmón a modo de ejemplo en modo de siembra de células.
- La fig. 5 es un dibujo esquemático de un biorreactor de pulmón a modo de ejemplo en modo de perfusión.
- La fig. 6 es un dibujo esquemático de un biorreactor de pulmón a modo de ejemplo.

### 20 Descripción detallada

Este documento se refiere a procedimientos y materiales implicados en la generación de órganos. La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de biorreactores configurados para generar tejido de pulmón funcional que pueden usarse para proporcionar un entorno más realista para el crecimiento de órganos de las vías respiratorias funcionales para su trasplante a seres humanos y otros animales. El tejido de pulmón se genera sobre una matriz dada, por ejemplo, una matriz de tejido de pulmón artificial o descelularizado.

30 Tal como se usa en el presente documento, un tejido de pulmón "funcional" realiza la mayoría o todas las funciones de un pulmón sano normal, por ejemplo, permite el transporte de oxígeno desde el aire al torrente sanguíneo, y la liberación de dióxido de carbono desde el torrente sanguíneo al aire. Humidifica el aire inhalado, produce tensoactivo para disminuir la tensión superficial en los alveolos y produce y transporta moco para eliminar la materia particulada inhalada desde las vías respiratorias distales hasta las proximales.

35 Tal como se usa en el presente documento, los términos "descelularizado" y "acelular" se usan de manera intercambiable y se definen como la ausencia completa o casi completa de partes intracelulares, células endoteliales, células epiteliales y núcleos detectables en secciones histológicas usando procedimientos de tinción histológica convencionales. Preferiblemente, pero no necesariamente, también se han eliminado los residuos celulares residuales del órgano o tejido descelularizado.

### 40 Matrices de órganos/tejidos descelularizados

Se conocen en la técnica procedimientos y materiales para preparar una matriz de tejido de pulmón descelularizado. Puede usarse cualquier material apropiado para preparar una matriz de este tipo. En un modo de realización preferido, una matriz de tejido puede ser un almacén de tejido acelular desarrollado a partir de tejido de pulmón descelularizado. Por ejemplo, puede descelularizarse tejido tal como pulmones humanos, o una parte de los mismos, mediante un procedimiento apropiado para eliminar células nativas del tejido al tiempo que se mantiene la integridad morfológica y la vasculatura del tejido o parte del tejido y se conservan las proteínas de la matriz extracelular (ECM). En algunos casos, pueden usarse pulmones de cadáveres, o partes de los mismos. Los procedimientos de descelularización pueden incluir someter el tejido (por ejemplo, tejido de pulmón) a ciclos de congelación-descongelación repetidos usando nitrógeno líquido. En otros casos, puede someterse un tejido a un medio de alteración celular aniónico o iónico tal como dodecilsulfato de sodio (SDS), polietilenglicol (PEG) o TritonX-100. El tejido también puede tratarse con una disolución de nucleasas (por ejemplo, ribonucleasa, desoxirribonucleasa) y lavarse en solución salina tamponada con fosfato estéril con agitación suave. En algunos casos, la descelularización puede realizarse canulando los vasos, conductos y/o cavidades del órgano o tejido usando procedimientos y materiales conocidos en la técnica. Tras la etapa de canulación, el órgano o tejido puede perfundirse por medio de la cánula con un medio de alteración celular tal como se describió anteriormente. La perfusión a través del tejido puede ser anterógrada o retrógrada, y la direccionalidad puede alternarse para mejorar la eficacia de perfusión. Dependiendo del tamaño y peso de un órgano o tejido y del/de los detergente(s) aniónico(s) o iónico(s) particular(es) y de la concentración de detergente(s) aniónico(s) o iónico(s) en el medio de alteración celular, se perfunde un tejido generalmente desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 12 horas por gramo de tejido con medio de alteración celular. Incluyendo los lavados, un órgano puede perfundirse durante hasta de aproximadamente 12 a aproximadamente 72 horas por gramo de tejido. La perfusión se ajusta generalmente a las condiciones fisiológicas incluyendo la velocidad de flujo y la presión.

65 El tejido descelularizado puede consistir esencialmente en el componente de la matriz extracelular (ECM) de todas o

la mayoría de las regiones del tejido, incluyendo componentes de la ECM del árbol vascular. Los componentes de la ECM pueden incluir cualquiera o todos de los siguientes: fibronectina, fibrilina, laminina, elastina, miembros de la familia del colágeno (por ejemplo, colágeno I, III y IV), glicosaminoglicanos, sustancia triturada, fibras reticulares y trombospondina, que pueden permanecer organizados como estructuras definidas tales como la lámina basal. En un modo de realización preferido, la matriz de tejido de pulmón descelularizado conserva una vasculatura sustancialmente intacta. La conservación de una vasculatura sustancialmente intacta permite la conexión de la matriz de tejido con el sistema vascular de un sujeto tras el trasplante. Además, una matriz de tejido descelularizado puede tratarse además con, por ejemplo, irradiación (por ejemplo, UV, gamma) para reducir o eliminar la presencia de cualquier tipo de microorganismo que permanezca sobre o en una matriz de tejido descelularizado.

Se conocen en la técnica procedimientos para obtener matrices de tejido descelularizado usando medios físicos, químicos, y enzimáticos, véase, por ejemplo, Liao *et al.*, *Biomaterials* 29(8):1065-74 (2008); Gilbert *et al.*, *Biomaterials* 27(9):3675-83 (2006); Teebken *et al.*, *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 19:381-86 (2000). Véanse también las publicaciones de patente estadounidense n.ºs 2009/0142836; 2005/0256588; 2007/0244568; y 2003/0087428.

#### Matrices de órganos artificiales

Se conocen en la técnica procedimientos y materiales para preparar una matriz de órgano artificial. Puede usarse cualquier material apropiado para preparar una matriz de este tipo. En un modo de realización preferido, una matriz de órgano artificial puede ser un armazón desarrollado a partir de materiales porosos tales como, por ejemplo, poli(ácido glicólico), Pluronic F-127 (PF-127), esponja de Gelfoam, colágeno-glicosaminoglicano (GAG), hidrogel de fibrinógeno-fibronectina-vitronectina (FFVH) y elastina. Véase, por ejemplo, Ingenito *et al.*, *J Tissue Eng Regen Med.* 17 de diciembre de 2009; Hoganson *et al.*, *Pediatric Research*, mayo de 2008, 63(5):520-526; Chen *et al.*, *Tissue Eng.* septiembre-octubre de 2005; 11(9-10):1436-48. En algunos casos, una matriz de órgano artificial puede tener estructuras porosas similares a unidades alveolares. Véase Andrade *et al.*, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* Febrero de 2007; 292(2):L510-8. En algunos casos, una matriz de órgano artificial implantada puede expresar marcadores específicos de órgano (por ejemplo, marcadores específicos de pulmón para células Clara, neumocitos y epitelio respiratorio). En algunos casos, una matriz de órgano artificial implantada puede organizarse en estructuras identificables (por ejemplo, estructuras similares a alveolos y bronquios terminales en una matriz de pulmón artificial). Por ejemplo, una matriz de pulmón artificial implantada preparada usando FFVH puede promover la unión de células, propagación y expresión de matriz extracelular *in vitro* e injerto aparente *in vivo*, con evidencia de efectos tróficos sobre el tejido circundante. Véase Ingenito *et al.*, citado anteriormente. Véanse también las patentes estadounidenses n.ºs 7.662.409 y 6.087.552; las publicaciones de patente estadounidense n.ºs 2010/0034791; 2009/0075282; 2009/0035855; 2008/0292677; 2008/0131473; 2007/0059293; 2005/0196423; 2003/0166274; 2003/0129751; 2002/0182261; 2002/0182241; y 2002/0172705.

#### Siembra de células

En los procedimientos descritos en el presente documento, una matriz de tejido de pulmón, por ejemplo, matriz de tejido de pulmón descelularizado o matriz de pulmón artificial, se siembra con células, por ejemplo, células diferenciadas o regenerativas.

Cualquier tipo de célula regenerativa apropiada, tales como tipos de células no diferenciadas o vírgenes, puede usarse para sembrar la matriz de tejido de pulmón. Tal como se usa en el presente documento, las células regenerativas pueden incluir, sin limitación, células progenitoras, células precursoras y células madre derivadas de "adulto" incluyendo células de cordón umbilical (por ejemplo, células endoteliales de vena umbilical humanas) y células madre fetales. Las células regenerativas también pueden incluir tipos de células diferenciadas o comprometidas. Las células madre apropiadas para los procedimientos y materiales proporcionados en el presente documento pueden incluir células madre pluripotentes inducidas humanas (iPSC), células madre mesenquimatosas, células endoteliales de vena umbilical humanas, células progenitoras de adulto multipotentes (MAPC) o células madre embrionarias. En algunos casos, también pueden usarse células regenerativas derivadas de otros tejidos. Por ejemplo, pueden usarse células regenerativas derivadas de piel, hueso, músculo, médula ósea, sinovio o tejido adiposo para desarrollar matrices de tejido sembradas con células madre.

En algunos casos, una matriz de tejido de pulmón proporcionada en el presente documento puede sembrarse adicionalmente con tipos de células diferenciadas tales como células epiteliales y células endoteliales humanas. Por ejemplo, una matriz de pulmón puede sembrarse con células endoteliales por medio de la vasculatura, y células epiteliales y mesenquimatosas, y células endoteliales de vena umbilical humanas (HUVEC) a través de siembra por perfusión.

Puede usarse cualquier procedimiento apropiado para aislar y recoger células para la siembra. Por ejemplo, pueden obtenerse generalmente células madre pluripotentes inducidas a partir de células somáticas "reprogramadas" a un estado pluripotente mediante la expresión ectópica de factores de transcripción tales como Oct4, Sox2, Klf4, c-MYC, Nanog y Lin28. Véanse Takahashi *et al.*, *Cell* 131:861-72 (2007); Park *et al.*, *Nature* 451:141-146 (2008); Yu *et al.*, *Science* 318:1917-20 (2007). Pueden aislarse células madre de sangre de cordón a partir de sangre de cordón umbilical nueva o congelada. Pueden aislarse células madre mesenquimatosas a partir de, por ejemplo, médula

ósea no purificada sin procesar o médula ósea purificada con ficol. Pueden aislarse células endoteliales y epiteliales y recogerse a partir de donantes vivos o cadáveres, por ejemplo, a partir del sujeto que recibirá el pulmón bioartificial, según procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden obtenerse células epiteliales a partir de una muestra de tejido cutáneo, y pueden obtenerse células endoteliales a partir de una muestra de tejido vascular. En algunos modos de realización, se perfunden enzimas proteolíticas en la muestra de tejido a través de un catéter colocado en la vasculatura. Partes del tejido tratado enzimáticamente pueden someterse a alteración mecánica y enzimática adicional. La mezcla de células obtenida de esta manera puede separarse para purificar células endoteliales y epiteliales. En algunos casos, pueden usarse procedimientos basados en citometría de flujo (por ejemplo, clasificación celular activada por fluorescencia) para clasificar células basándose en la presencia o ausencia de marcadores de superficie celular específicos. En casos en los que se usan células no autólogas, debe considerarse la selección de células inmunitarias de tipo coincidente, de modo que el órgano o tejido no se rechace cuando se implanta en un sujeto.

Pueden enjuagarse células aisladas en una disolución tamponada (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato) y resuspenderse en un medio de cultivo celular. Pueden usarse procedimientos de cultivo celular convencionales para cultivar y expandir la población de células. Una vez obtenidas, las células pueden ponerse en contacto con una matriz de tejido para sembrar la matriz. Por ejemplo, una matriz de tejido puede sembrarse con al menos un tipo de célula *in vitro* a cualquier densidad celular apropiada. Por ejemplo, las densidades celulares para sembrar una matriz pueden ser de al menos  $1 \times 10^3$  células/gramo de matriz. Las densidades celulares pueden oscilar entre aproximadamente  $1 \times 10^5$  y aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  células/gramo de matriz (por ejemplo, pueden usarse al menos 100.000, 1.000.000, 10.000.000, 100.000.000, 1.000.000.000 ó 10.000.000.000 células/gramo de matriz).

En algunos casos, una matriz de tejido de pulmón descelularizado o artificial tal como se proporciona en el presente documento puede sembrarse con los tipos de células y las densidades celulares descritos anteriormente mediante siembra por perfusión. Por ejemplo, puede usarse un sistema de perfusión por flujo para sembrar la matriz de tejido de pulmón descelularizado por medio del sistema vascular conservado en la matriz de tejido. En algunos casos, pueden usarse sistemas de perfusión por flujo automatizados en las condiciones apropiadas. Tales procedimientos de siembra por perfusión pueden mejorar las eficacias de siembra y proporcionar una distribución de células más uniforme por toda la composición. Pueden usarse técnicas de análisis de imágenes y bioquímicas cuantitativas para evaluar la distribución de células sembradas tras los procedimientos de siembra por perfusión o estáticos.

En algunos casos, una matriz de tejido puede impregnarse con uno o más factores de crecimiento para estimular la diferenciación de las células regenerativas sembradas. Por ejemplo, una matriz de tejido puede impregnarse con factores de crecimiento apropiados para los procedimientos y materiales proporcionados en el presente documento, por ejemplo, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factores de crecimiento de TGF- $\beta$ , proteínas morfogenéticas óseas (por ejemplo, BMP-1, BMP-4), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (b-FGF), por ejemplo, FGF-10, factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF) o factor de diferenciación de crecimiento-5 (GDF-5). Véase, por ejemplo, Desai y Cardoso, *Respir. Res.* 3:2 (2002).

Pueden incubarse matrices de tejido sembradas durante un periodo de tiempo (por ejemplo, desde varias horas hasta aproximadamente 14 días o más) tras la siembra para mejorar la fijación y penetración de las células en la matriz de tejido. La matriz de tejido sembrada puede mantenerse en condiciones en las que al menos algunas de las células regenerativas pueden multiplicarse y/o diferenciarse dentro de y sobre la matriz de tejido acelular. Tales condiciones pueden incluir, sin limitación, la temperatura y/o presión apropiada, actividad eléctrica y/o mecánica (por ejemplo, ventilación), fuerza, las cantidades apropiadas de O<sub>2</sub> y/o CO<sub>2</sub>, una cantidad apropiada de humedad, y condiciones estériles o casi estériles. Tales condiciones también pueden incluir ventilación húmeda, ventilación de húmeda a seca y ventilación seca. En algunos casos, pueden añadirse complementos nutricionales (por ejemplo, nutrientes y/o una fuente de carbono tal como glucosa), hormonas exógenas o factores de crecimiento a la matriz de tejido sembrada. Pueden realizarse histología y tinción celular para someter a ensayo la propagación de las células sembradas. Puede realizarse cualquier procedimiento apropiado para someter a ensayo la diferenciación de las células sembradas. En general, los procedimientos descritos en el presente documento se realizarán en un aparato de biorreactor de órganos de las vías respiratorias, por ejemplo, tal como se describe en el presente documento.

Por tanto los procedimientos descritos en el presente documento pueden usarse para generar un tejido de pulmón bioartificial trasplantable, por ejemplo, para trasplantarlo a un sujeto humano. Tal como se describe en el presente documento, un tejido trasplantable conservará preferiblemente una vasculatura suficientemente intacta que puede conectarse al sistema vascular del paciente.

Los tejidos de pulmón bioartificial descritos en el presente documento pueden combinarse con material de envasado para generar artículos de fabricación o kits. Se conocen bien componentes y procedimientos para producir artículos de fabricación. Además de los tejidos bioartificiales, un artículo de fabricación o kit puede incluir además, por ejemplo, uno o más antiadhesivos, agua estéril, portadores farmacéuticos, tampones y/u otros reactivos para promover el desarrollo de tejido de pulmón funcional *in vitro* y/o su posterior trasplante. Además, pueden incluirse en tales artículos de fabricación instrucciones impresas que describen cómo puede usarse la composición contenida en los mismos. Los componentes en un artículo de fabricación o kit pueden envasarse en una variedad de recipientes

adecuados.

#### Procedimientos para usar pulmones bioartificiales

5 Este documento también proporciona procedimientos y materiales para usar tejidos de pulmón bioartificial y, en algunos casos, promover la función del pulmón. En algunos modos de realización, los procedimientos proporcionados en el presente documento pueden usarse para restaurar la función del pulmón en pacientes que tienen enfermedades que alteran o reducen la capacidad del pulmón (por ejemplo, fibrosis quística, EPOC, enfisema, cáncer de pulmón, asma, traumatismo del pulmón, u otras anomalías del pulmón genéticas o congénitas, por ejemplo, quiste broncogénico, agénesis pulmonar e hipoplasia, lóbulo polialveolar, displasia alveolocapilar, secuestro incluyendo malformación arteriovenosa (MAV) y síndrome de cimitarra, linfangiectasia pulmonar, enfisema lobar congénito (ELC) y malformación adenomatoide quística (MAQ) y otros quistes del pulmón). Los procedimientos proporcionados en el presente documento también incluyen aquellos en los que se identifica que el sujeto necesita un tratamiento establecido particular, por ejemplo, aumento de la función del pulmón, o aumento o mejora de la capacidad del pulmón.

Pueden generarse tejidos de pulmón bioartificial (por ejemplo, órganos completos o partes de los mismos) según los procedimientos proporcionados en el presente documento. En algunos modos de realización, los procedimientos comprenden trasplantar un tejido de pulmón bioartificial tal como se proporciona en el presente documento a un sujeto (por ejemplo, un paciente humano) que lo necesita. En algunos modos de realización, se trasplanta un tejido de pulmón bioartificial al sitio de tejido enfermo o dañado. Por ejemplo, pueden trasplantarse tejidos de pulmón bioartificial a la cavidad torácica de un sujeto en lugar de (o conjuntamente con) un pulmón que no funciona o que funciona mal; se conocen en la técnica procedimientos para realizar trasplante de pulmón, véanse, por ejemplo, Boasquevisque *et al.*, Surgical Techniques: Lung Transplant and Lung Volume Reduction, Proceedings of the American Thoracic Society 6:66-78 (2009); Camargo *et al.*, Surgical maneuvers for the management of bronchial complications in lung transplantation, Eur J Cardiothorac Surg 2008;34:1206-1209 (2008); Yoshida *et al.*, "Surgical Technique of Experimental Lung Transplantation in Rabbits," Ann Thorac Cardiovasc Surg. 11(1):7-11 (2005); Venuta *et al.*, Evolving Techniques and Perspectives in Lung Transplantation, Transplantation Proceedings 37(6):2682-2683 (2005); Yang y Conte, Transplantation Proceedings 32(7):1521-1522 (2000); Gaissert y Patterson, Surgical Techniques of Single and Bilateral Lung Transplantation in The Transplantation and Replacement of Thoracic Organs, 2ª ed. Springer Netherlands (1996).

Los procedimientos pueden incluir el trasplante de un pulmón bioartificial o parte del mismo tal como se proporciona en el presente documento durante un procedimiento quirúrgico para extirpar parcial o completamente el pulmón de un sujeto y/o durante una resección de pulmón. En algunos casos, los procedimientos proporcionados en el presente documento pueden usarse para reemplazar o complementar tejido de pulmón y la función en un sujeto, por ejemplo, un sujeto humano o animal.

Puede realizarse cualquier procedimiento apropiado para someter a ensayo la función del pulmón antes o después del trasplante. Por ejemplo, pueden realizarse procedimientos para evaluar la curación del tejido, para evaluar la funcionalidad y para evaluar el crecimiento interno celular. En algunos casos, pueden recogerse partes de tejido y tratarse con un fijador tal como, por ejemplo, formalina tamponada neutra. Tales partes de tejido pueden deshidratarse, incrustarse en parafina y cortarse con un micrótopo para su análisis histológico. Pueden teñirse secciones con hematoxilina y eosina (H&E) y luego montarse sobre portaobjetos de vidrio para la evaluación microscópica de la morfología y celularidad. Por ejemplo, pueden realizarse la histología y tinción celular para detectar la propagación de células sembradas. Los ensayos pueden incluir la evaluación funcional de la matriz de tejido trasplantada o técnicas de obtención de imágenes (por ejemplo, tomografía computarizada (CT), ultrasonidos u obtención de imágenes por resonancia magnética (por ejemplo, IRM de contraste potenciado)). Los ensayos pueden incluir además pruebas funcionales en reposo y estrés fisiológico (por ejemplo, pletismografía corporal, pruebas de la función del pulmón). La funcionalidad de la matriz sembrada con células puede someterse a ensayo usando procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, histología, microscopía electrónica y pruebas mecánicas (por ejemplo, de volumen y distensibilidad). Puede medirse el intercambio gaseoso como otro ensayo de funcionalidad. Para someter a ensayo la proliferación celular, puede medirse la actividad timidina cinasa, por ejemplo, detectando la incorporación de timidina. En algunos casos, pueden realizarse pruebas sanguíneas para evaluar la función de los pulmones basándose en los niveles de oxígeno en la sangre.

En algunos casos, pueden usarse técnicas de biología molecular tales como RT-PCR para cuantificar la expresión de marcadores metabólicos y de diferenciación. Puede usarse cualquier protocolo de RT-PCR apropiado. En resumen, puede recogerse ARN total mediante homogeneización de una muestra biológica (por ejemplo, muestra de tendón), realizar una extracción con cloroformo y extraer el ARN total usando una columna de centrifugación (por ejemplo, columna de centrifugación RNeasy® Mini (QIAGEN, Valencia, CA)) u otro sustrato de unión a ácido nucleico. En otros casos, pueden detectarse marcadores asociados con tipos de células de pulmón y diferentes estadios de diferenciación para tales tipos de células usando anticuerpos e inmunoensayos convencionales.

65 Aparato de biorreactor de órganos de las vías respiratorias

En la fig. 1 se presenta un aparato de biorreactor de órganos de las vías respiratorias a modo de ejemplo. A lo largo de toda la memoria descriptiva, se ofrecerá un pulmón como ejemplo de un órgano de las vías respiratorias. Otros ejemplos pueden incluir, por ejemplo, una tráquea.

5 En referencia a la fig. 1, los componentes del biorreactor incluyen una cámara de pulmón 102, un conector de las vías respiratorias que incluye una línea traqueal 124, una línea de ventilación húmeda 150 y una línea de ventilación  
 10 seca 134, sistema de ventilador húmedo 120, sistema de ventilador seco 116 y 118, conector de tres vías 148 en la unión entre la línea traqueal 124, línea de ventilación húmeda 150 y línea de ventilación seca 134, y controlador (no  
 15 mostrado). El controlador funciona por ordenador, pero también puede hacerse funcionar manualmente. El biorreactor también puede incluir una línea arterial pulmonar 122, una línea venosa pulmonar 126, un sistema de depósito 104 y 106, una bomba de rodillo 114, un tanque de gas 122 y líneas de gas adjuntas, una cámara de poscarga 110, una línea de retorno venoso pulmonar 136, y una línea de presión de cámara de pulmón 128. El biorreactor incluye además una cámara de distensión 109 y drenaje 146 de cámara de distensión. El biorreactor puede incluir además un oxigenador de membrana además o en su lugar para proporcionar oxigenación y carbonatación de disoluciones de medios de perfusión (no mostrado).

La cámara de pulmón 102 contiene un almacén de matriz de pulmón descelularizado. La cámara de pulmón 102 se  
 20 cierra para proporcionar un entorno de cultivo de pulmón estéril. La arteria pulmonar de la matriz de pulmón se conecta a la línea arterial pulmonar 122 y la vena pulmonar de la matriz de pulmón se conecta a la vena arterial pulmonar 126, cada una por medio de cánulas vasculares. La tráquea de la matriz de pulmón se conecta al conector de las vías respiratorias por medio de la línea traqueal 124.

Dentro de la cámara de pulmón 102, se perfunde la matriz de células de manera anterógrada con un medio celular  
 25 con el fin de permitir la siembra de células para hacer crecer el pulmón. La perfusión tiene lugar a lo largo de la línea arterial pulmonar 122 hasta la arteria pulmonar. Desde allí, el medio fluye a través de la vasculatura pulmonar y fluye hacia fuera hasta el sistema de depósito (104 y 106).

El sistema de depósito incluye un primer depósito 104 y un segundo depósito 106, así como una línea de  
 30 alimentación de depósito 140 y un drenaje (140) de depósito. El medio celular circula entre los depósitos 104 y 106 a través de la línea de alimentación de depósito 138 y el drenaje 140 de depósito. Puede colocarse opcionalmente un microfiltro en la línea de alimentación 140 para lograr una filtración estéril. El medio celular también se oxigena en los depósitos 104 y 106. Para la perfusión, el medio celular se alimenta desde el depósito 104 a través de la línea arterial pulmonar 122 por medio de la bomba de rodillo 114 o por medio de gravedad hasta la arteria pulmonar.

35 El medio que fluye hacia fuera hasta el depósito 106 se aspira directamente desde la cámara de pulmón 102 por medio del drenaje (4) de cámara de pulmón para mantener un nivel de fluido constante dentro de la cámara de pulmón 102. El medio que fluye hacia fuera del pulmón por medio del tercer conector 126 se drena hasta la cámara de poscarga 110 por medio de gravedad y se aspira por medio del drenaje 136 de cámara de poscarga hasta el depósito 106. La cámara de poscarga 110 está conectada a la cámara de pulmón 102 por medio de la línea de  
 40 presión de cámara de pulmón 130 y el depósito 106 por medio de la línea de retorno venoso pulmonar 136. La línea de presión de cámara de pulmón equilibra las presiones en la cámara de pulmón 102 y la cámara de poscarga 110. La cámara de poscarga 110 también está conectada a la cámara de pulmón 102 por medio de la tráquea y la línea de ventilación húmeda a través de la unión de tres vías 156.

45 Un procedimiento a modo de ejemplo de reintroducción de células en la matriz es tal como sigue. Durante la perfusión de la matriz de pulmón, comienza la celularización de la matriz. Se siembran aproximadamente 100 millones de células mesenquimatosas suspendidas en aproximadamente 30 cc de medio por medio de la línea arterial pulmonar 122. Las células mesenquimatosas son células madre embrionarias derivadas de la médula ósea, pero también pueden ser, por ejemplo, iPS o células hematopoyéticas tal como se describe en el documento  
 50 U.S.S.N. 12/233.017, "Generation of Inner Ear Cells.". En algunos modos de realización, tras la finalización de la siembra, se detiene la perfusión, por ejemplo, durante aproximadamente 60 minutos, para permitir la unión de las células. Durante la detención de la perfusión, se drena el medio celular desde la tráquea y la vena pulmonar; el medio celular drenado fluye entonces hasta el depósito 106. Tras la detención de 60 minutos, continúa la perfusión con medio solo, por ejemplo, durante aproximadamente 24 horas. Para mantener un nivel de medio constante en la  
 55 cámara de distensión 109, puede conectarse al depósito 104 por medio de una línea adicional (no mostrada).

A continuación, se establecen las condiciones para la siembra de células endoteliales. La línea traqueal 124 está  
 60 conectada a la línea de ventilación húmeda 150 por medio de la unión de tres vías 148 y su controlador. La unión de tres vías 156 se gira, usando su controlador, para conectar la línea de ventilación húmeda 150 a la cámara de distensión 109. La cámara de distensión 109 proporciona una presión de vías respiratorias húmedas positiva (wAP) para limitar el flujo de medio neto a través del espacio intersticial y la tráquea al tiempo que se limita la presión de las vías respiratorias hasta un intervalo fisiológico. La wAP se ajusta a través de un ajuste de la cámara 109. Como resultado, una parte del medio celular se drena a través de la línea venosa pulmonar (3) hasta el depósito 106, al tiempo que una parte más pequeña del medio celular se drena por medio del sistema linfático a través de la línea de  
 65 drenaje de cámara de pulmón 128 hasta el depósito 106.

- 5 Se siembran aproximadamente 100 millones de células endoteliales suspendidas en aproximadamente 15 cc de media a través de la línea arterial pulmonar 122 durante aproximadamente 10 minutos de alimentación por gravedad. Tras la finalización de la siembra, se detiene la perfusión, por ejemplo, durante aproximadamente 60 minutos para permitir la unión de las células. Tras la detención, se continúa la perfusión, por ejemplo, durante aproximadamente 3-5 días para permitir la formación de una monocapa de células endoteliales.
- 10 Tras haberse sembrado las células endoteliales y haberse formado la monocapa de células endoteliales, las células epiteliales están listas para sembrarse. Para la siembra de células epiteliales, se gira la unión de tres vías 156, usando su controlador, para ocluir la línea de ventilación húmeda 150. Se siembran aproximadamente 200 millones de células epiteliales suspendidas en aproximadamente 15 cc de medio a través de la línea traqueal 124 al interior de la tráquea. En algunos modos de realización, las células epiteliales son neumocitos. Tras la finalización de la siembra, se detiene la perfusión por medio de la arteria pulmonar, por ejemplo, durante aproximadamente 60 minutos.
- 15 Además, una vez que se ha completado la siembra con células del pulmón, se necesita ventilación húmeda para hacer avanzar la suspensión de células al interior de las vías respiratorias periféricas. El sistema de ventilador húmedo 120 proporciona ventilación húmeda al pulmón a lo largo de la línea de ventilación húmeda 150.
- 20 La unión de tres vías 156 se gira, usando su controlador, para conectar la línea de ventilación húmeda 150 a la cámara de distensión 109. Se aumenta la wAP para proporcionar un flujo pequeño al espacio intersticial y aumentar la unión de las células. Se proporciona ventilación húmeda al pulmón durante aproximadamente 5 minutos, se mantiene durante aproximadamente 60 minutos, luego se proporciona al pulmón durante aproximadamente otros 5 minutos, y luego se mantiene durante aproximadamente 24 horas. La ventilación húmeda se proporciona a volumen tidal fisiológico (aproximadamente 500 ml para un ser humano) al tiempo que a una tasa reducida para mantener una baja presión espiratoria e inspiratoria pico húmeda. Se proporciona una presión espiratoria positiva húmeda por medio de la elevación de la cámara de distensión 109.
- 25 Una vez reanudada la perfusión, se proporcionan perfusión anterógrada y ventilación húmeda durante un periodo de aproximadamente 5 días para permitir la formación de tejido.
- 30 Se realiza un cambio de ventilación húmeda a seca después del periodo de aproximadamente 5 días o después de que una monitorización (no mostrada) determine que el pulmón ha alcanzado una madurez suficiente. Se administra tensoactivo artificial por medio de la línea traqueal 124. Entonces se gira la unión de tres vías 148, usando su controlador, de modo que la línea traqueal 124 se conecta a la línea de ventilación seca 150 y el sistema de ventilación seca (116 y 118). El sistema de ventilación seca incluye la cámara de ventilación seca 112 que tiene un nebulizador (no mostrado) para proporcionar aire humidificado, un primer ventilador seco 116 y un segundo ventilador seco 118. La cámara de ventilación seca 112 está conectada al primer ventilador seco 116 por medio de una línea de PEEP seca 144 y a la línea traqueal por medio de la línea de ventilación seca 150. De este modo, el pulmón se ventila para llenar lentamente su espacio de aire con gas en vez de fluido. El gas usado es carbógeno suministrado por medio de la línea de gas mediante el tanque de gas 122. El ventilador seco 116 está configurado para proporcionar una dPEEP a la cámara de ventilación seca 112 y posteriormente permitir el drenaje de fluido en la cámara de pulmón 102.
- 35 40
- 45 A continuación, se interrumpe el sistema 120 de ventilación húmeda y se abre el ventilador seco 118 a la cámara de pulmón con el fin de aumentar la tasa de ventilación hasta la tasa fisiológica, vaciar la cámara de pulmón 102 de fluido y rodear el pulmón de aire humidificado dentro de la cámara de pulmón 102. Tras aproximadamente 3 días de maduración del tejido, se realiza un análisis del gas perfundido para confirmar la formación de tejido funcional y que el pulmón pueda retirarse del biorreactor.
- 50 En el cambio entre la ventilación húmeda y la ventilación seca, el pulmón se desarrolla en condiciones que simulan las condiciones en las que se desarrolla un pulmón de manera natural. Se ha determinado que este entorno es necesario para el desarrollo del pulmón, y que el biorreactor tal como se describe proporciona un sistema y procedimientos necesarios para generar pulmones obtenidos por ingeniería de tejidos para su trasplante.
- 55 En la fig. 2A se ilustra un procedimiento a modo de ejemplo de celularización de una matriz de pulmón. Se coloca 210 una matriz de pulmón en la cámara de pulmón. La matriz de pulmón se perfunde 220 entonces con un medio celular a lo largo de una línea arterial pulmonar. Se le proporciona 230 entonces a la matriz de pulmón ventilación húmeda. Finalmente, se le proporciona 240 a la matriz de pulmón ventilación seca.
- 60 Durante la perfusión 220 de la matriz de pulmón, tal como se ilustra en la fig. 2B, la matriz de pulmón se siembra 222 con células madre mesenquimatosas u otras a lo largo de la vasculatura del pulmón. La matriz de pulmón se siembra 224 entonces con células endoteliales a lo largo de la vasculatura del pulmón. La matriz de pulmón se siembra 226 entonces con células epiteliales a lo largo de las vías respiratorias del pulmón.
- 65 Para proporcionar la ventilación húmeda, tal como se ilustra en la fig. 2C, las vías respiratorias del pulmón se conectan 231 a un ventilador húmedo a lo largo de una línea de ventilador húmedo. El pulmón se conecta 232

entonces a una cámara de distensión por medio de una línea de ventilación húmeda. Ajustando la altura de un fluido dentro de la cámara de distensión, se aumenta 233 entonces la presión de vías respiratorias húmedas a lo largo de la línea de ventilación húmeda. Además, elevando la cámara de distensión, se proporciona 234 entonces una PEEP húmeda (wPEEP). Se monitoriza 235 el grado de maduración del pulmón que crece sobre la matriz de pulmón. Si se determina 236 que el grado de maduración es aceptable, entonces se comienza 237 la transición a una ventilación seca.

Para proporcionar la ventilación seca, tal como se ilustra en la fig. 2D, se aplica 241 un tensioactivo artificial a través de la tráquea. La tráquea se conecta 242 entonces a una cámara de ventilación seca por medio de una línea de ventilación seca. La cámara de ventilación seca se conecta 243 a un primer ventilador seco a lo largo de una línea de dPEEP. Se aumenta 244 entonces la presión de vías respiratorias secas a lo largo de la línea de ventilación seca. La línea de ventilación húmeda se interrumpe 245, y la cámara de pulmón se conecta 246 a un segundo ventilador seco.

Un pulmón de rata completo puede requerir, en total, entre aproximadamente 200 y aproximadamente 400 millones de células. La extrapolación a seres humanos proporciona una estimación de entre aproximadamente 20 y aproximadamente 40 miles de millones de células para lograr un pulmón completo. Generar tal número de células puede requerir más tiempo del que un paciente puede disponer. Un paciente que requiere un porcentaje de función del pulmón, por ejemplo, del 20%, necesitaría solo aproximadamente el 20% de este número y tendría que esperar proporcionalmente menos tiempo que para un nuevo pulmón.

En la fig. 3 se presenta un aparato de biorreactor de órganos de las vías respiratorias a modo de ejemplo para su uso en la descelularización de órganos. Tal como se describió anteriormente, se ofrecerá un pulmón como ejemplo de un órgano de las vías respiratorias. En referencia a la fig. 3, los componentes del biorreactor incluyen cámara de pulmón 302, depósito de gravedad 304 sellado y depósito 306 grande, en donde los depósitos 304 y 306 contienen disolución de descelularización para su perfusión al interior del pulmón en la cámara de pulmón 302. La disolución de descelularización circula entre los depósitos 304 y 306 a través de una línea de alimentación de depósito 314. La arteria pulmonar de la matriz de pulmón se conecta a la línea arterial pulmonar 308 a través de la cual se perfunde la disolución de descelularización al interior del tejido de pulmón por medio de flujo por gravedad desde el depósito 304. Tras la descelularización, se eliminan los desechos de la cámara de pulmón 302. En algunos casos, disolución de la cámara de pulmón 302 se recircula por medio de la bomba 312 que alimenta el depósito 306.

En la fig. 4 se presenta un aparato de biorreactor de órganos de las vías respiratorias a modo de ejemplo para su uso en la siembra de células. En referencia a la fig. 4, los componentes del biorreactor incluyen cámara de pulmón 402, depósito de gravedad 404 sellado y depósito 406 grande, en donde los depósitos 404 y 406 contienen medio celular para su perfusión al interior del pulmón en la cámara de pulmón 402. El medio celular circula entre los depósitos 404 y 406 a través de la línea de alimentación de depósito 408. La arteria pulmonar de la matriz de pulmón se conecta a la línea arterial pulmonar 410 y la vena pulmonar de la matriz de pulmón se conecta a la línea de vena pulmonar 412, cada una por medio de cánulas vasculares. Para la siembra de células, se alimenta medio celular desde el depósito 404 a través de la línea arterial pulmonar 410 por medio de una bomba o por medio de gravedad a la arteria pulmonar. El medio que fluye hacia fuera del pulmón por medio del tercer conector 412 (flujo de salida venoso) se drena hasta la cámara de distensión de poscarga 420 por medio de gravedad y se aspira por medio del drenaje de cámara de poscarga hasta el depósito 406. La cámara de poscarga 420 está conectada a la cámara de pulmón 402 por medio de la línea de presión de cámara de pulmón y el depósito 406 por medio de la línea de retorno venoso pulmonar 412. La línea de presión de la cámara de pulmón equilibra las presiones en la cámara de pulmón 402 y la cámara de poscarga 420. La cámara de poscarga 420 también está conectada a la cámara de pulmón 402 por medio de la tráquea y la línea de ventilación húmeda a través de la unión de tres vías 414.

La línea traqueal está conectada a la línea de ventilación húmeda por medio de la unión de tres vías 414 y su controlador. La unión de tres vías 414 se gira, usando su controlador, para conectar la línea de ventilación húmeda a la cámara de distensión 420. La cámara de distensión 420 proporciona presión de vías respiratorias húmedas positiva (wAP) para limitar el flujo de medio neto a través del espacio intersticial y la tráquea al tiempo que se limita la presión de las vías respiratorias hasta un intervalo fisiológico. La wAP se ajusta a través de un ajuste de la cámara 420. Como resultado, una parte del medio celular se drena a través de la línea venosa pulmonar 412 hasta el depósito 406, al tiempo que una parte más pequeña del medio celular se drena por medio del sistema linfático a través de la línea de drenaje de cámara de pulmón hasta el depósito 406.

En la fig. 5 se presenta un aparato de biorreactor de órganos de las vías respiratorias a modo de ejemplo para su uso en la perfusión de la matriz. En referencia a la fig. 5, los componentes del biorreactor incluyen cámara de pulmón 502, depósito de gravedad 504 sellado y depósito 506 grande, en donde los depósitos 504 y 506 contienen disolución de perfusión (por ejemplo, sangre) para su perfusión al interior del pulmón en la cámara de pulmón 502. El medio celular circula entre los depósitos 504 y 506 a través de la línea de alimentación de depósito 508. La arteria pulmonar de la matriz de pulmón se conecta a línea arterial pulmonar 510 y la vena pulmonar de la matriz de pulmón se conecta a la vena arterial pulmonar 512, cada una por medio de cánulas vasculares. Tras la siembra de las células, se necesita ventilación húmeda para hacer avanzar la suspensión de células al interior de las vías

respiratorias periféricas. El sistema de ventilador húmedo 518 proporciona ventilación húmeda al pulmón a lo largo de la línea de ventilación húmeda. Entonces se gira la unión de tres vías 514, usando su controlador, de modo que la línea traqueal se conecta a la línea de ventilación seca y el sistema de ventilación seca 516.

5 En la fig. 6 se presenta un aparato de biorreactor de órganos de las vías respiratorias a modo de ejemplo. En referencia a la fig. 6, los componentes del biorreactor incluyen cámara de pulmón 602, depósito de gravedad 616 sellado y depósito 606 grande, en donde los depósitos 616 y 606 contienen disolución de perfusión para su perfusión al interior del pulmón en la cámara de pulmón 602. La disolución circula entre los depósitos 616 y 606 a través de una línea de alimentación de depósito. La arteria pulmonar de la matriz de pulmón se conecta a la línea arterial pulmonar 626 y la vena pulmonar de la matriz de pulmón se conecta a la vena arterial pulmonar 628, cada una por medio de cánulas vasculares. Para la siembra de células, se alimenta medio desde el depósito 616 a través de la línea arterial pulmonar 626 por medio de una bomba o por medio de gravedad a la arteria pulmonar. El medio que fluye hacia fuera del pulmón por medio del tercer conector 628 (flujo de salida venoso) se drena hasta la cámara de distensión de poscarga 604 por medio de gravedad y se aspira por medio del drenaje de cámara de poscarga hasta el depósito 606. Para mantener un nivel de medio constante en la cámara de distensión 604, puede conectarse al depósito 606 por medio de una línea adicional (no mostrado). El sistema de ventilador húmedo 624 proporciona ventilación húmeda al pulmón a lo largo de una línea de ventilación húmeda. Se gira la unión de tres vías 620, usando su controlador, para conectar la línea de ventilación húmeda a la cámara de distensión 604.

20 Se realiza un cambio de ventilación húmeda a seca tras el periodo de aproximadamente 5 días o después de que una monitorización (no mostrada) determine que el pulmón ha alcanzado madurez suficiente. Se administra tensioactivo artificial por medio de la línea traqueal 630. Entonces se gira la unión de tres vías 620, usando su controlador, de modo que la línea traqueal 630 se conecta a la línea de ventilación seca y el sistema de ventilación seca 622. El pulmón se ventila para llenar lentamente su espacio de aire con gas en vez de fluido.

25 La invención se describirá adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

### 30 Ejemplo

#### Regeneración de pulmón basándose en la perfusión de armazones de matriz descelularizados

35 Se aislaron pulmones de ratas SD adultas heparinizadas (n=20) y se descelularizaron usando perfusión con detergente. Se analizaron los armazones de matriz extracelular (ECM) resultantes usando histología, microscopía electrónica y pruebas mecánicas. Se montaron los armazones en un biorreactor y se sembraron con células endoteliales de cordón umbilical humanas (HUVEC, n=4), HUVEC y células epiteliales basales alveolares humanas (H-A549, n=4), y HUVEC y células de pulmón fetal de rata (H-FLC, n=2). Se mantuvo el cultivo hasta siete días. Se analizó la función del pulmón en un aparato de pulmón aislado usando perfusión de sangre y ventilación, pulmones normales sirvieron como controles (n=4).

40 La descelularización por perfusión de pulmones de cadáveres produjo armazones de ECM de pulmón acelulares con arquitectura vascular y vías respiratorias intactas. Los armazones de pulmón pudieron repoblarse con células endoteliales y epiteliales y se mantuvieron en un biorreactor. El intercambio gaseoso (razón  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ) fue inferior en construcciones de H-A549 (103,6 mmHg), e igual en construcciones de H-FLC (455,1 mmHg) en comparación con pulmón normal (465,8 mmHg). Se redujo la distensibilidad en pulmones descelularizados (0,27 ml/cm de  $\text{H}_2\text{O/s}$ ), pero fue igual en construcciones de H-FLC (0,67 ml/cm de  $\text{H}_2\text{O/s}$ ) y pulmón normal (0,69 ml/cm de  $\text{H}_2\text{O/s}$ ).

45 La descelularización por perfusión de pulmones de cadáveres produce armazones de ECM de pulmón completo intactos que pueden sembrarse con células epiteliales y endoteliales para formar pulmones bioartificiales con ventilación, perfusión e intercambio gaseoso comparable a pulmones normales.

### 50 OTROS MODOS DE REALIZACIÓN

55 Debe entenderse que aunque la invención se ha descrito conjuntamente con la descripción detallada de la misma, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que se define mediante el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

**REIVINDICACIONES**

1. Aparato de biorreactor de órganos de las vías respiratorias, que comprende:
- 5 una cámara de órganos configurada para contener un armazón de matriz de órganos de las vías respiratorias de manera que puede profundirse un medio celular para hacer crecer un órgano de las vías respiratorias;
- 10 un sistema de ventilador húmedo (120) configurado para suministrar una ventilación húmeda al órgano de las vías respiratorias, en el que dicha ventilación húmeda proporciona fluido a una vía respiratoria del órgano de las vías respiratorias;
- 15 un sistema de ventilador seco (116, 118) configurado para suministrar una ventilación seca al órgano de las vías respiratorias, en el que dicha ventilación seca proporciona gas a la vía respiratoria del órgano de las vías respiratorias; y un controlador configurado para controlar el suministro de ventilación húmeda o el suministro de ventilación seca.
2. El aparato según la reivindicación 1, que comprende además:
- 20 un conector (148) que incluye una primera ramificación, una segunda ramificación y una tercera ramificación configuradas para conectarse al órgano de las vías respiratorias; y una primera unión de tres vías (156) en la que están conectadas la primera ramificación del conector (148) y la segunda ramificación del conector con la tercera ramificación del conector, incluyendo la unión de tres vías (156) un conmutador configurado para bascular entre la primera ramificación y la segunda ramificación;
- 25 en el que:
- 30 el sistema de ventilador húmedo (120) está configurado para suministrar una ventilación húmeda al órgano por medio de la primera ramificación del conector;
- 35 el sistema de ventilador seco (116, 118) está configurado para suministrar una ventilación seca al órgano por medio de la segunda ramificación del conector; y
- 40 el controlador está configurado para controlar el conmutador de la primera unión de tres vías, controlando de ese modo el suministro de ventilación húmeda o el suministro de ventilación seca.
3. El aparato según la reivindicación 1, que comprende además
- 40 un sistema de depósito (104, 106) configurado para:
- 45 suministrar medio celular al órgano a lo largo de una línea de entrada; y
- 45 drenar medio de desecho del órgano de las vías respiratorias a lo largo de una línea de salida, incluyendo la línea de salida una primera ramificación, una segunda ramificación y una tercera ramificación; y
- 50 una segunda unión de tres vías en la que la primera ramificación de la línea de salida y la segunda ramificación de la línea de salida están conectadas con la tercera ramificación de la línea de salida.
4. El aparato según la reivindicación 2, en el que el sistema de ventilador húmedo (120) comprende:
- 50 un ventilador húmedo conectado a la cámara de órganos por medio de una línea de ventilación húmeda (150); y
- 55 una cámara de distensión (109) conectada al órgano por medio de la primera ramificación del conector.
5. El aparato según la reivindicación 4, en el que se proporciona una presión espiratoria positiva húmeda (wPEEP) a la cámara de órganos por medio de una elevación de la cámara de distensión (109).
6. El aparato según la reivindicación 3, que comprende además
- 60 una cámara de poscarga (110) conectada a:
- 65 la cámara de órganos por medio de la segunda ramificación de la línea de salida; y
- 65 el sistema de depósito (104, 106) por medio de una línea de retorno de salida.

7. El aparato según la reivindicación 6, en el que el sistema de depósito (104, 106) comprende:  
un primer depósito (104) conectado a la cámara de órganos por medio de una línea de entrada; y  
5 un segundo depósito (106) conectado a:  
la cámara de órganos por medio de un drenaje de cámara de órganos; y  
la cámara de poscarga (110) por medio de la línea de retorno de salida,  
10 en el que el primer depósito (104) y el segundo depósito (106) hacen circular medio a lo largo de una línea de alimentación de depósito y un drenaje de depósito.
8. El aparato según la reivindicación 2, en el que el sistema de ventilador seco (116, 118) comprende:  
15 una cámara de ventilación seca (112) que incluye un nebulizador, conectado al órgano por medio de la segunda ramificación del conector; y  
un primer ventilador seco (116) configurado para proporcionar una presión espiratoria positiva seca (dPEEP) a la cámara de órganos y conectado a la cámara de ventilación seca (112) por medio de una línea de dPEEP, y opcionalmente un segundo ventilador seco (118) conectado a la cámara de órganos por medio de una línea de ventilador seco.  
20
9. Procedimiento *ex vivo* para proporcionar una matriz de pulmón bioartificial, comprendiendo el procedimiento:  
25 proporcionar una matriz de tejido de pulmón que comprende una vía respiratoria y vasculatura sustancial;  
sembrar la matriz de tejido de pulmón con células, con la condición de que dichas células no sean células madre embrionarias humanas;  
30 proporcionar a la matriz de tejido de pulmón ventilación húmeda durante un tiempo suficiente para que se produzca un primer grado deseado de maduración del órgano, para producir un órgano maduro húmedo, en el que dicha ventilación húmeda proporciona fluido a la vía respiratoria de la matriz de tejido de pulmón; y  
35 proporcionar al órgano maduro húmedo ventilación seca durante un tiempo suficiente para que se produzca un segundo grado deseado de maduración del órgano, en el que dicha ventilación seca proporciona gas a la vía respiratoria del órgano maduro húmedo proporcionando de ese modo un pulmón bioartificial funcional.  
40
10. El procedimiento según la reivindicación 9, que comprende además  
sembrar la matriz de tejido de pulmón con células endoteliales a través de la vasculatura de la matriz de  
45 tejido de pulmón; y  
sembrar la matriz de tejido de pulmón con células epiteliales a través de la vía respiratoria de la matriz de tejido de pulmón.
11. El procedimiento según la reivindicación 10, que comprende además  
50 monitorizar el grado de maduración del órgano hasta que se haya producido el primer grado deseado de maduración del órgano, para producir el órgano maduro húmedo;  
detener la ventilación húmeda al órgano maduro húmedo;  
55 aplicar un tensioactivo artificial al órgano maduro húmedo; y  
comenzar la ventilación seca al órgano maduro húmedo.
12. El procedimiento según la reivindicación 9, en el que proporcionar a la matriz de tejido de pulmón ventilación húmeda comprende:  
60 conectar la vía respiratoria a un ventilador húmedo por medio de una línea de ventilador húmedo;  
65 conectar la matriz de tejido de pulmón a una cámara de distensión (109) por medio de una línea de ventilación húmeda (150);

- aumentar la presión de vía respiratoria húmeda a lo largo de la línea de ventilación húmeda (150); y
- 5 proporcionar una presión espiratoria positiva húmeda (wPEEP) a la matriz de tejido de pulmón elevando la cámara de distensión (109).
13. El procedimiento según la reivindicación 9, en el que proporcionar al órgano maduro húmedo ventilación seca comprende:
- 10 conectar la vía respiratoria a una cámara de ventilación seca (112) por medio de una línea de ventilación seca (134);
- 15 conectar la cámara de ventilación seca (112) a un primer ventilador seco (116) a lo largo de una línea de presión espiratoria positiva seca (dPEEP);
- aumentar la presión de vía respiratoria seca a lo largo de la línea de ventilación seca (134);
- desconectar una línea de ventilación húmeda (150); y
- 20 conectar el órgano maduro húmedo a un segundo ventilador seco (118) por medio de una línea de ventilador seco.
14. El procedimiento según la reivindicación 9, en el que la matriz de tejido de pulmón comprende tejido de pulmón humano descelularizado o una matriz de pulmón artificial.
- 25 15. Pulmón bioartificial producido mediante el procedimiento según las reivindicaciones 9-14.
16. El procedimiento según la reivindicación 9, en el que la siembra comprende sembrar la matriz de tejido de pulmón con células madre, en particular en el que las células madre son células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea o células madre pluripotentes inducidas (iPS).
- 30

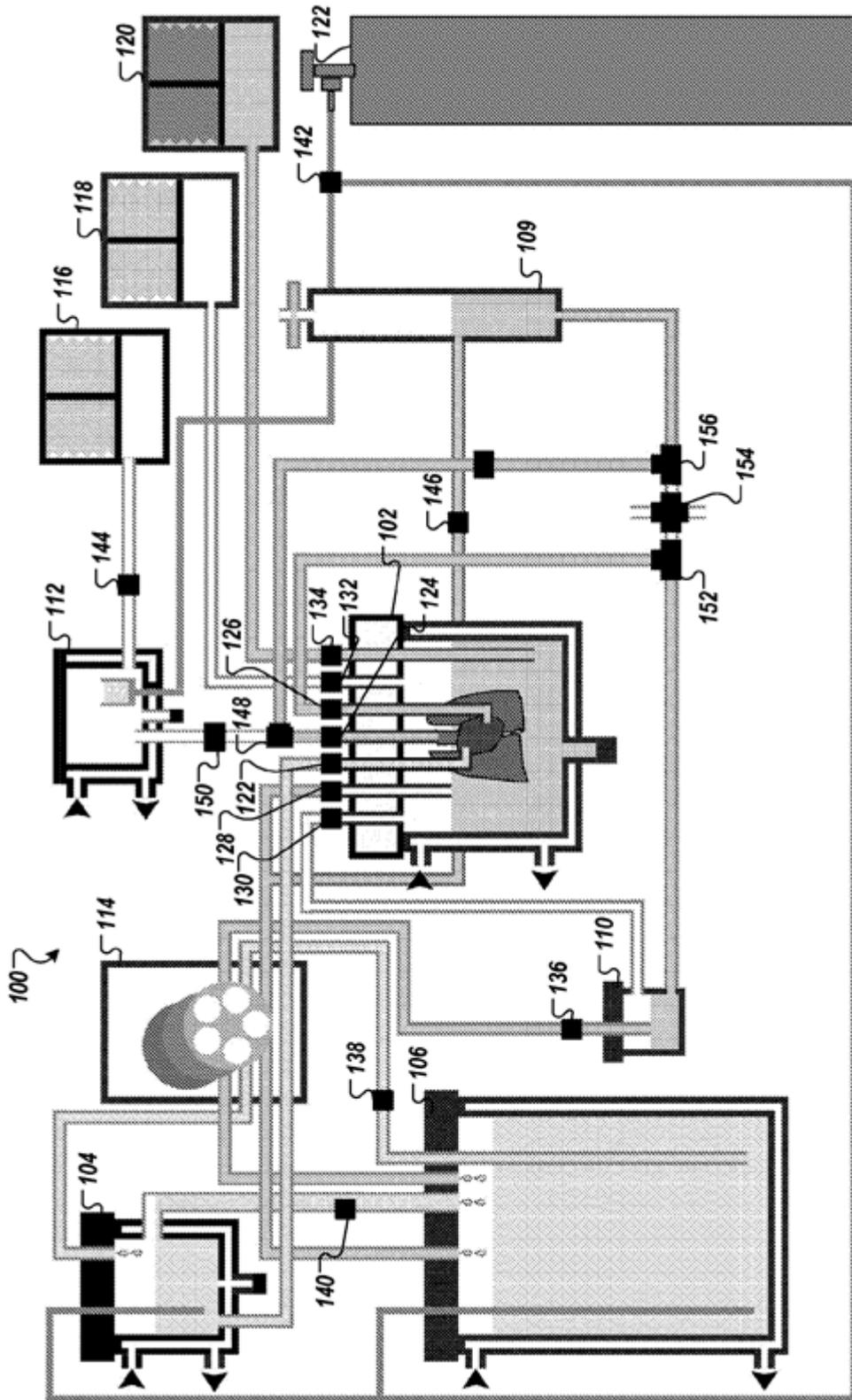


FIG. 1

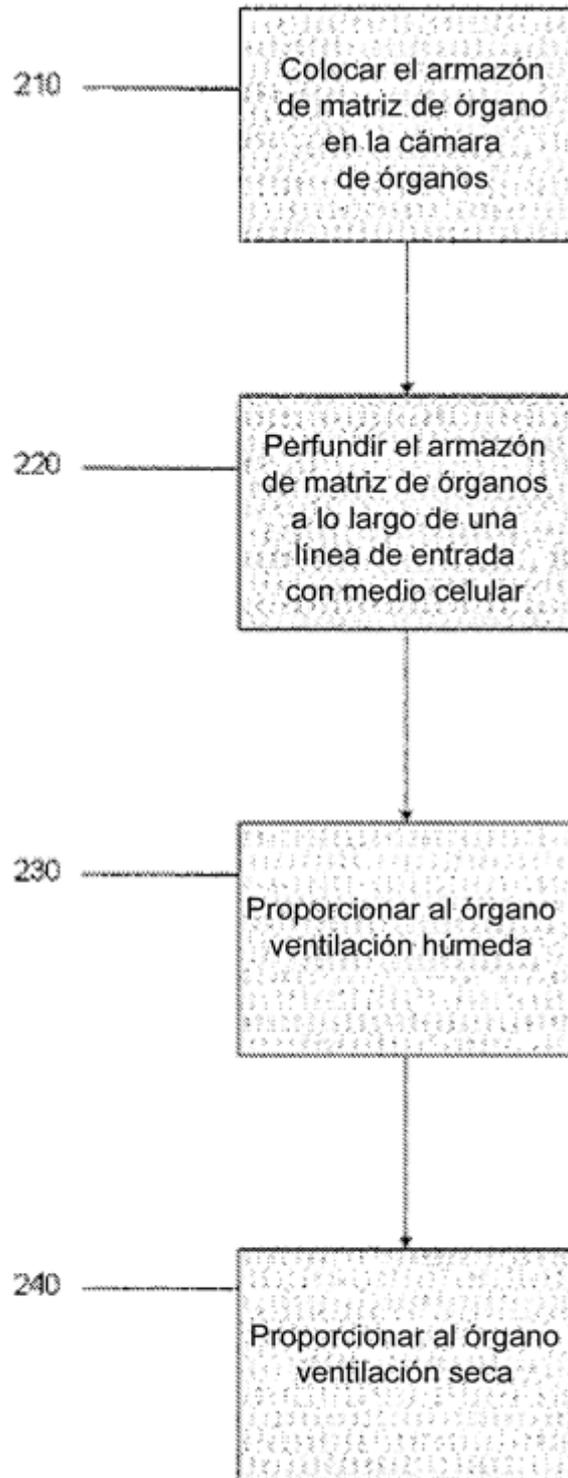
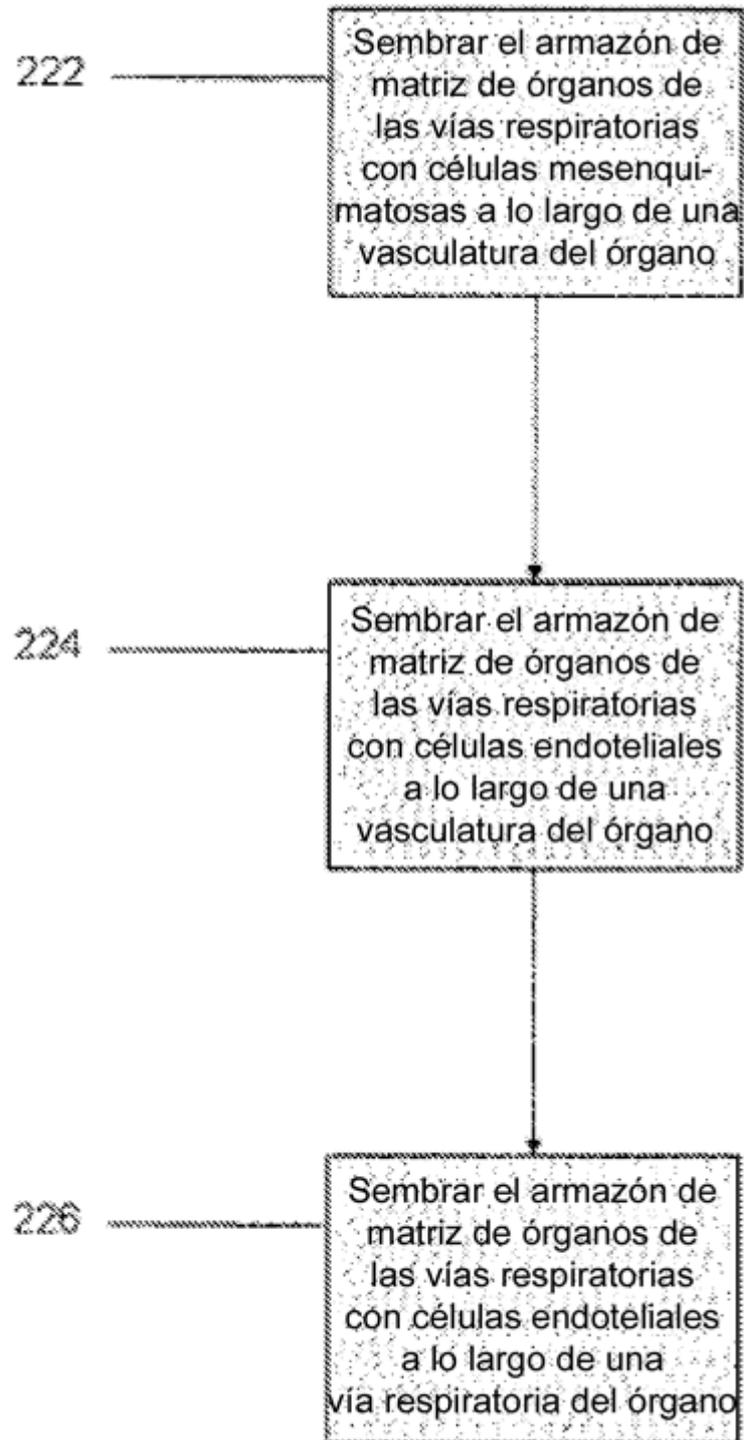


FIG. 2A



**FIG. 2B**

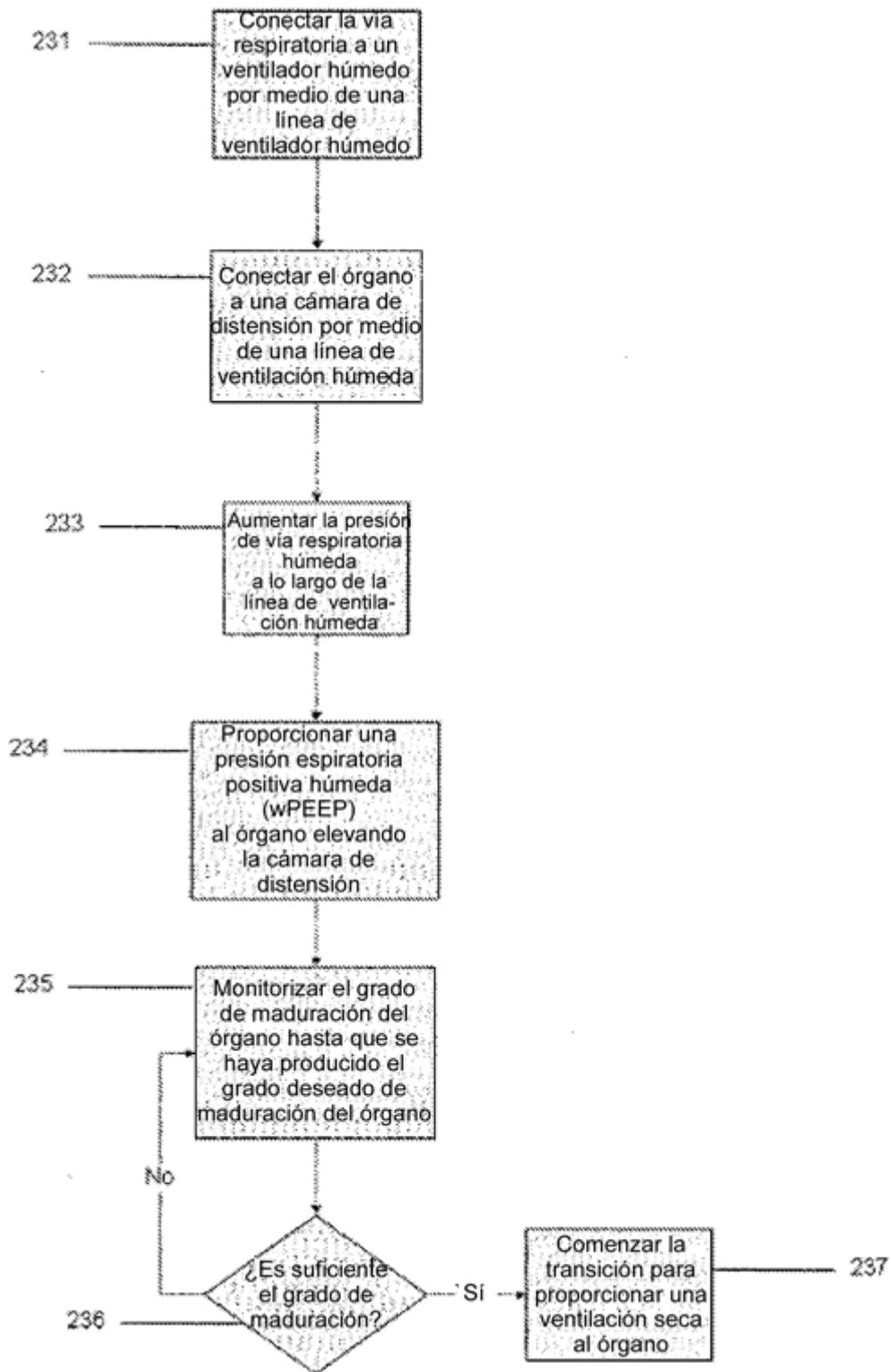


FIG. 2C

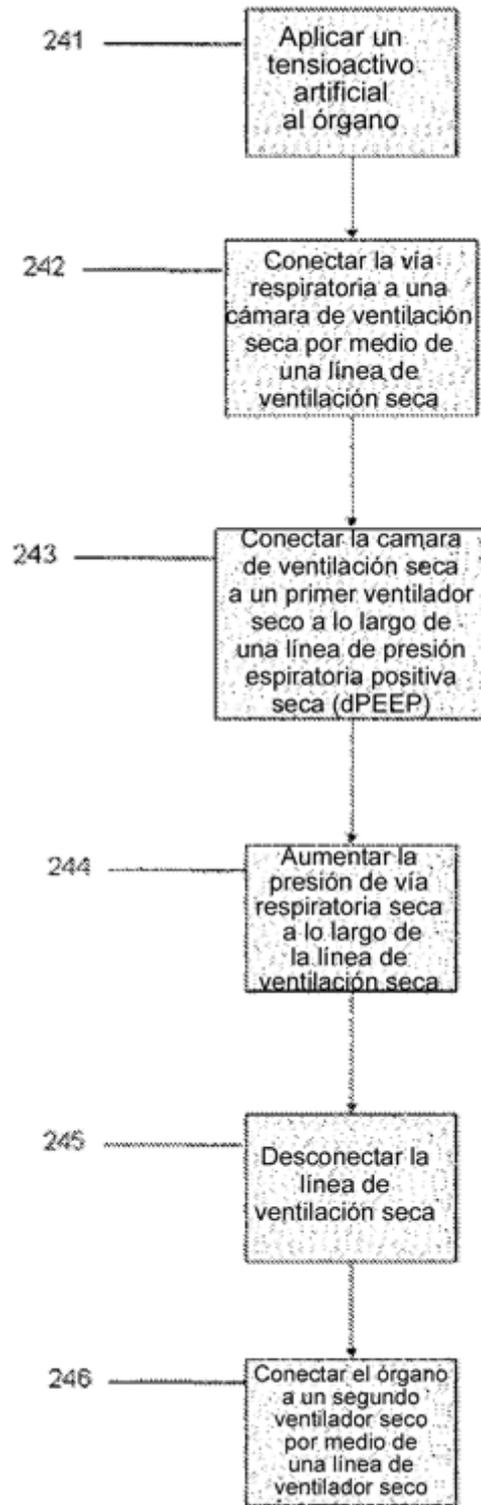


FIG. 2D

# Unidad de descelularización:

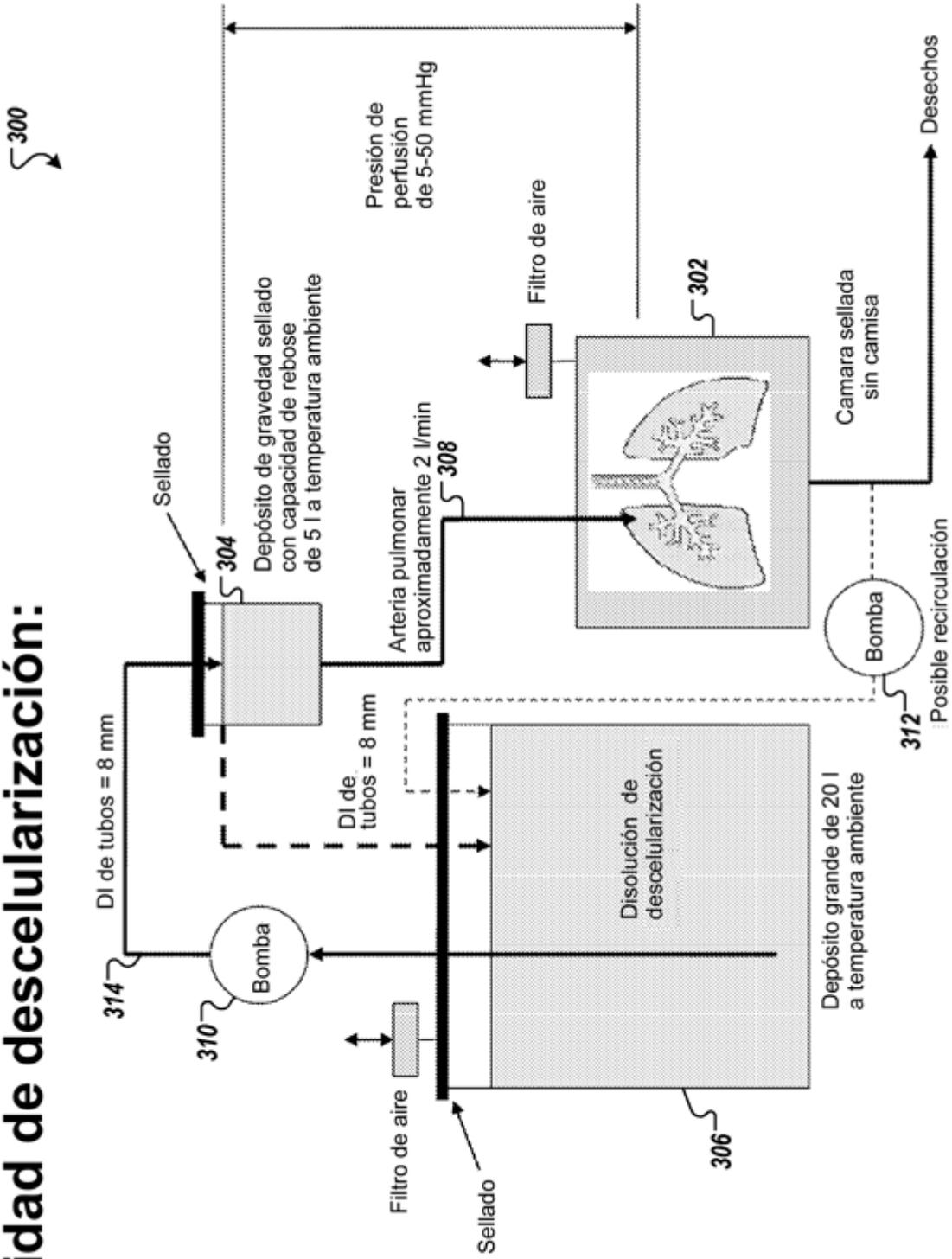


FIG. 3

# Unidad de perfusión/ventilación (modo de siembra) <sup>400</sup>

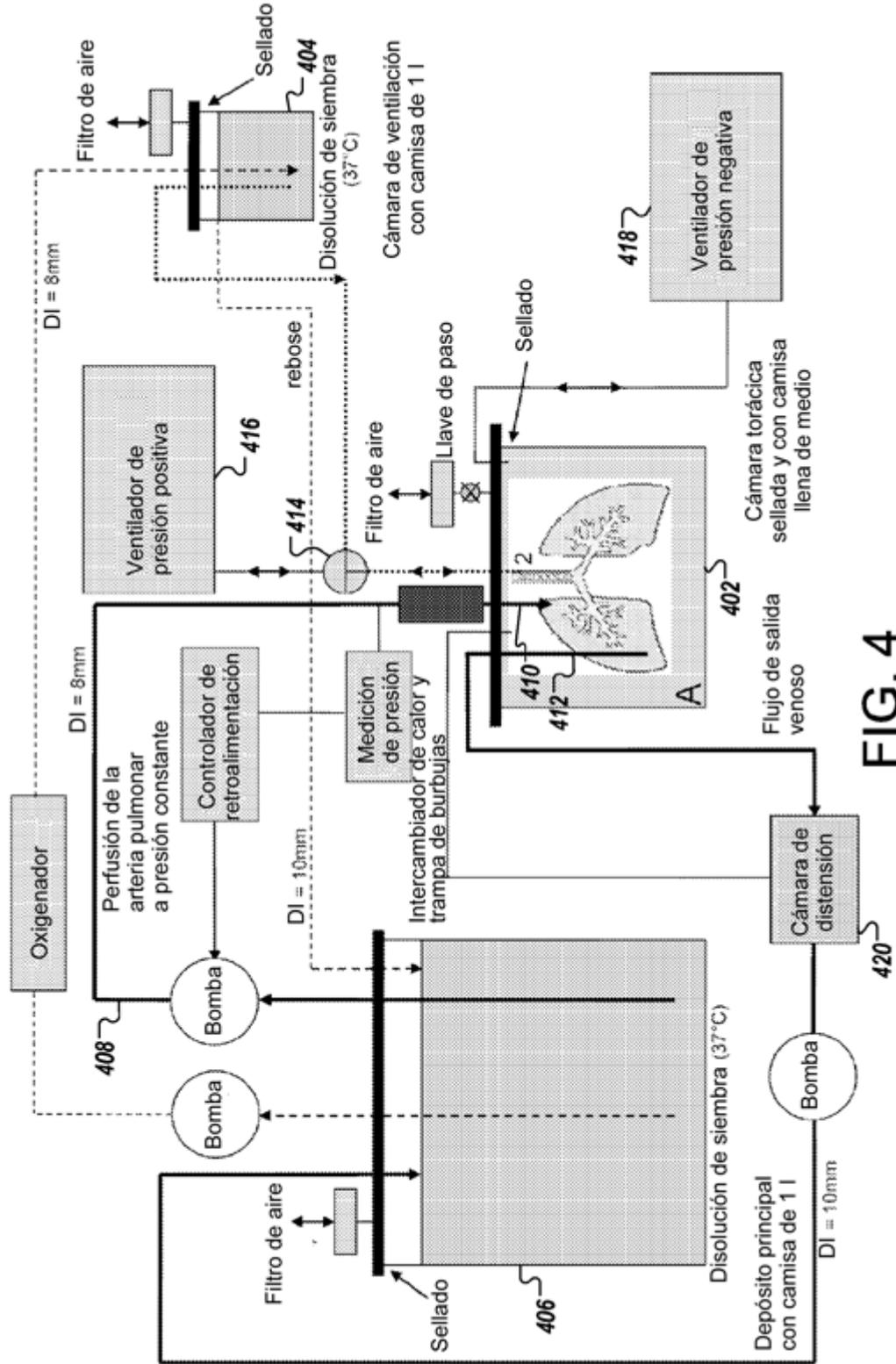
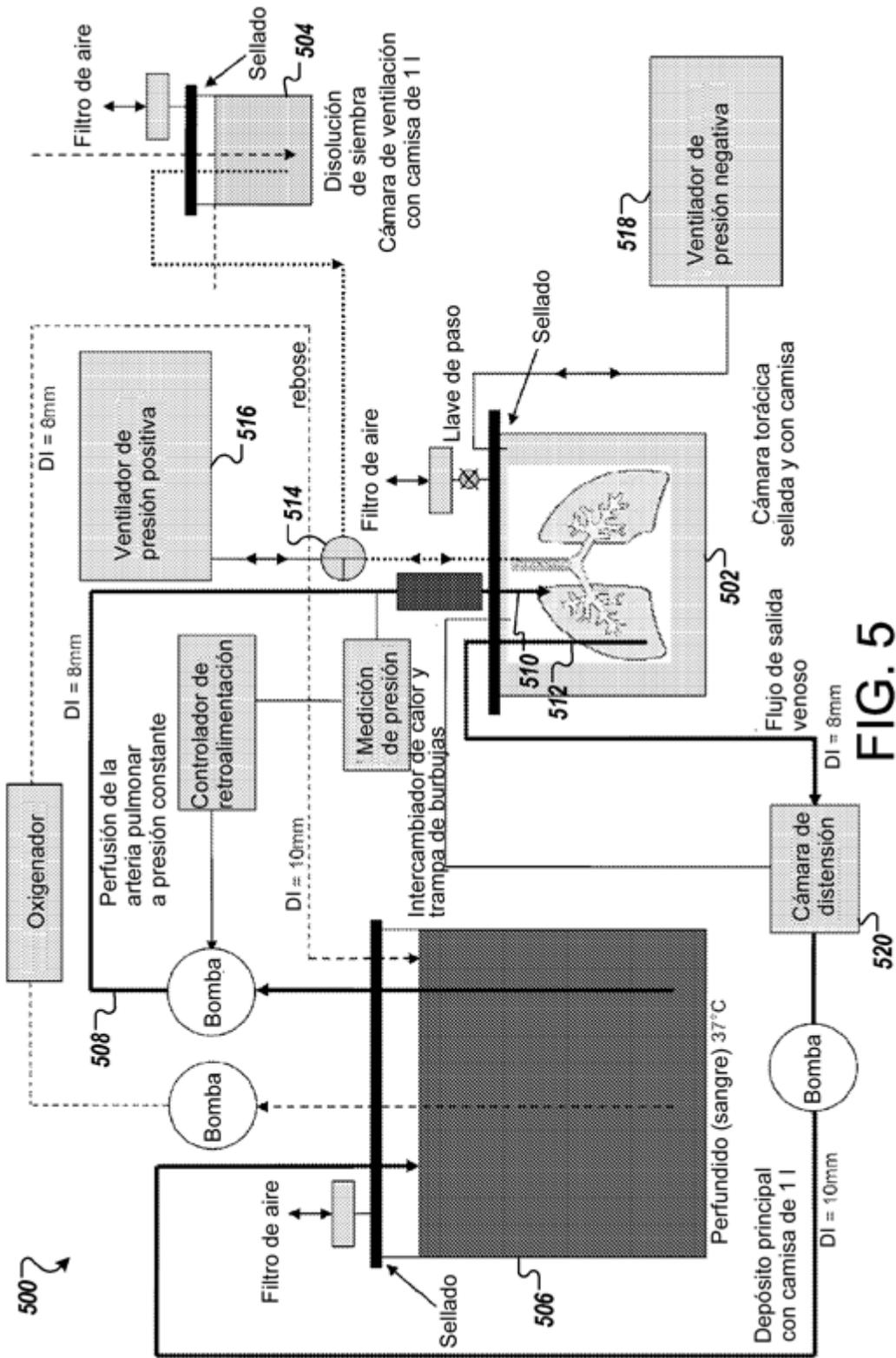


FIG. 4

# Unidad de perfusión/ventilación (modo de prueba de función)



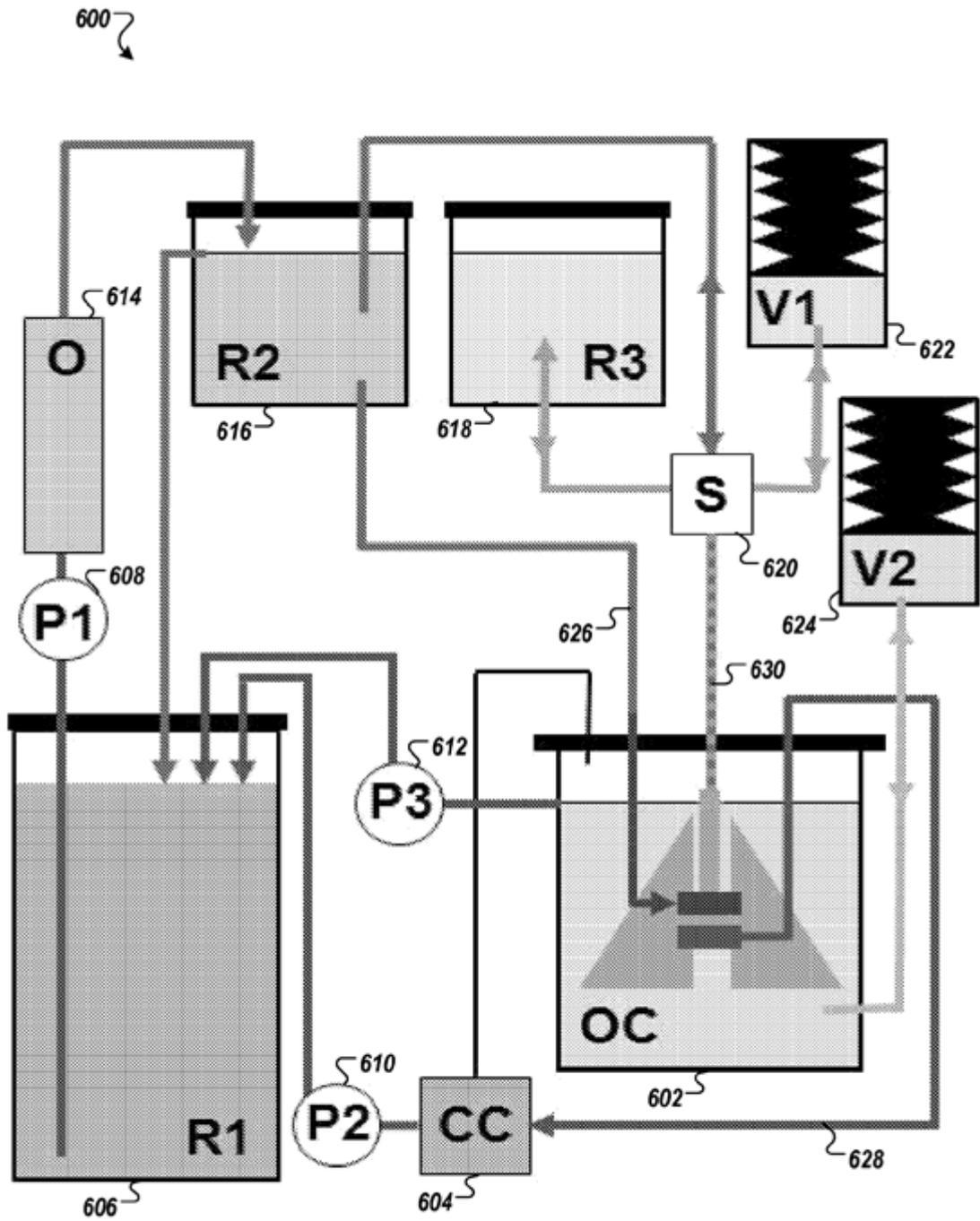


FIG. 6