

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 614 417**

51 Int. Cl.:

C12N 5/071 (2010.01)

C12M 3/06 (2006.01)

A61L 27/38 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.09.2008 PCT/US2008/076042**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.04.2009 WO09042418**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.09.2008 E 08833699 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2016 EP 2203553**

54 Título: **Método para la creación de sistemas de microvasos perfundibles**

30 Prioridad:

24.09.2007 US 860471

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

31.05.2017

73 Titular/es:

**NORTIS, INC. (100.0%)
17280 Woodinville-Redmond Road NE, Suite
B828
Woodinville, Washington 98072, US**

72 Inventor/es:

NEUMANN, THOMAS

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 614 417 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

Método para la creación de sistemas de microvasos perfundibles

5 **Campo de la invención**

La presente invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas y se refiere a métodos para el estudio del crecimiento vascular fisiológico y patológico y el crecimiento vascular en respuesta a factores angiogénicos o angiostáticos.

10

Antecedentes de la técnica

Durante los procesos normales de crecimiento vascular (por ejemplo, el ciclo menstrual, placentación, cambios en la adiposidad, reparación de heridas, inflamación), la creación de nuevos vasos sanguíneos se regula y eventualmente cesa. De manera significativa, la desregulación del crecimiento vascular es un elemento crítico de la patología. Por ejemplo, el crecimiento tumoral, la retinopatía diabética, la artritis y la psoriasis implican la proliferación excesiva de los vasos sanguíneos, lo que contribuye directamente al estado patológico. Por el contrario, el deterioro del crecimiento vascular, característica de los individuos de edad avanzada, compromete la curación de heridas y la revascularización de los tejidos que se han convertido en isquémicos por traumatismo o enfermedad. Por lo tanto, la comprensión de los mecanismos que dirigen el conjunto de nuevos vasos sanguíneos, y los procesos que inician y detienen el crecimiento vascular, son fundamentales para el desarrollo de estrategias para el control de la vascularización en la enfermedad.

15

20

25

Durante el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos (*angiogénesis*), surgen brotes de las células endoteliales que recubren los lúmenes de los capilares y las vénulas postcapilares, las ramas más pequeñas del sistema vascular. La angiogénesis es un proceso complejo, multietapa. Aunque los estudios publicados de angiogénesis son de muchos miles, los mecanismos celulares que median y regulan el crecimiento angiogénico y la morfogénesis, son poco conocidos.

30

Los detalles de la brotación angiogénica son difíciles de observar en “tiempo real” *in vivo* debido a la opacidad de la mayoría de los tejidos. Los cortes de tejido son difíciles de reconstruir en 3D y no comunican la naturaleza dinámica de crecimiento vascular, además, la región cercana a las puntas de los brotes angiogénicos, un área crítica del control de la invasión vascular y la morfogénesis, rara vez se encuentra en cortes de tejido. Con el fin de superar las limitaciones de la histología convencional, se ha desarrollado varios “modelos” de angiogénesis *in vivo* e *in vitro*.

35

Modelos de angiogénesis *in vivo*: Para eludir la opacidad de los tejidos vivos, los investigadores han observado angiogénesis a través de “ventanas” en los animales vivos que incluyen las larvas de anfibios que tienen de forma natural colas transparentes (Clark y Clark 1939), o cámaras de visión especializada, ya sea implantadas en las orejas de conejo (Clark y Clark 1939), piel de ratón (Algire, Chalkley et al. 1945) y bolsas en las mejillas del hámster (Greenblatt y Shubi 1968) o desarrolladas a partir de bolsillos corneales de conejo (Gimbrone, Cotran et al. 1974) o membranas corioalantoideas de polluelo (Ausprunk, Knighton et al. 1974). A partir de estos estudios iniciales, en su mayor parte descriptivos se produjo la validación del paradigma central de la quimiotaxis vascular inducida por el tumor y el correspondiente descubrimiento de moléculas derivadas de tumores que promueven el crecimiento vascular. Ensayos más recientes de la angiogénesis *in vivo* miden el crecimiento vascular en las esponjas poliméricas o tapones de proteínas de la membrana basal gelificadas implantadas subcutáneamente en roedores (Pissaniti, Taylor et al. 1992; Andrade, Machado et al. 1997; Akhtar, Dickerson et al. 2002; Koike, Vernon et al. 2003). A pesar de su utilidad, los enfoques *in vivo* son difíciles por: (1) la variación intraespecífica en respuesta angiogénica de un animal a otro; (2) la falta de traducción de los resultados de una especie a otra; (3) los altos costes de adquisición y mantenimiento de los animales; (4) la desaprobación pública de la utilización de animales con fines de investigación; y (5) las complejidades encontradas en cirugías de animales y en la visualización y evaluación de resultados.

40

45

50

Modelos dimensionales (2D) de angiogénesis *in vitro*: En un esfuerzo por comprender los mecanismos moleculares de la angiogénesis, se cultivaron células endoteliales aisladas de vasos grandes en placas planas hasta que formaron monocapas confluentes similares a un pavimento que simulaba los revestimientos endoteliales de los vasos sanguíneos (Jaffe, Nachman et al. 1973; Gimbrone 1976). Aunque son útiles como modelos de respuestas proliferativas a lesión endotelial en los vasos sanguíneos grandes (Gimbrone, Cottar et al. 1974; Fishman, Ryan et al. 1975; Madri y Stenn 1982; Madri y Pratt 1986; Jozaki, Marucha et al. 1990; Rosen, Meromsky et al. 1990), los cultivos en monocapa de células endoteliales sobre sustratos rígidos no se organizan normalmente en tubos similares a capilares en la simulación de la angiogénesis. En 1980, sin embargo, tras el éxito del cultivo a largo plazo de células endoteliales capilares (Folkman, Haudenschild et al. 1979), se describió que los cultivos de 20-40 días de células endoteliales capilares bovinas o humanas desarrollaban una red celular 2D en la parte superior de la monocapa celular confluyente, un proceso denominado “angiogénesis *in vitro*” (Folkman y Haudenschild 1980). Las células endoteliales de la red aparecían como “tubos” con “lúmenes” llenos de un material fibrilar/amorfo que fue interpretado como una red sintetizada endógenamente de “mandriles” sobre la que se organizaban las células. Estudios posteriores describieron la formación de una red 2D similar por las células endoteliales de los grandes vasos (Macing, Kadish et al. 1982; Madri 1982; Feder, Marasa et al. 1983) y por las células endoteliales sembradas en la parte superior de los geles hidratados, maleables, de las proteínas de la membrana basal (por ej., Matrigel®

55

60

65

gel) (Kubota, Kleinman et al. 1988).

Aunque los modelos 2D del desarrollo vascular siguen en uso hoy en día (el ensayo basado en Matrigel® (Kubota, Kleinman et al. 1988) está disponible comercialmente), estos modelos carecen de las siguientes 5 características que definen la verdadera angiogénesis;

1. Invasión - Las células endoteliales en los modelos 2D forman redes en la parte superior de la matriz extracelular y muestran poca tendencia a excavar en la matriz extracelular (Vernon, Angello et al. 1992; Vernon, Lara et al., 1995).

2. Direccionalidad - En modelos 2D, las redes de células endoteliales se forman *in vitro* más o menos simultáneamente a lo largo de un campo de células pre-posicionado, mientras que la angiogénesis *in vivo* implica la invasión vectorial de la matriz extracelular por brotes filamentosas que se ramifican por múltiples niveles de escalado.

3. Polaridad correcta - Aunque los modelos 2D producen tubos unicelulares que se parecen mucho a los capilares (Maciag, Kadish et al. 1982; Feder, Marasa et al. 1983; Sage y Vernon 1994), su polaridad es “de dentro a fuera”, es decir, depositan material de la membrana basal en sus superficies lumbales y tienen sus superficies trombogénicas orientadas hacia el exterior a los medios de cultivo circundantes (Maciag, Kadish et al. 1982; Feder, Marasa et al. 1983.), lo contrario a la situación *in vivo*.

4. Formación del lumen – Existen pocos datos que apunten a que los modelos 2D generan tubos de células endoteliales (CE) con lúmenes permeables. Generalmente, los tubos de células endoteliales tienen espacios “lumbales” que están llenos de matriz extracelular (ya sea exógena o sintetizada por las células) (Maciag, Kadish et al. 1982, Matri 1982; Feder, Marasa et al. 1983; Sage y Vernon 1994; Vernon, Lara et al. 1995). Si están presentes, los lúmenes permeables por lo general aparecen como espacios cilíndricos a modo de hendidura o estrechos delimitados por paredes gruesas de citoplasma de la célula endotelial, bastante diferentes de los tubos de células endoteliales de pared delgada, inflados, que son típicos de los capilares *in vivo*.

5. Especificidad de la célula - Las redes celulares en los modelos 2D son generadas por procesos mecánicos que se pueden lograr mediante tipos de células que no son CE (Vernon, Angello et al. 1992; Vernon, Lara et al., 1995). De hecho, los modelos matemáticos han demostrado que cualquier tipo de célula adherente capaz de aplicar fuerzas de tracción a la matriz extracelular maleable 2D (o bien sintetizada de forma endógena o suministrada (por ejemplo, gel de Matrigel®)) puede generar redes en condiciones óptimas (Manoussaki, Lubkin et al., 1996).

Modelos tridimensionales (3D) de angiogénesis *in vitro*: El reconocimiento de que la angiogénesis *in vivo* se produce dentro de una matriz extracelular 3D ha dado lugar a varios modelos en los que se induce la germinación dentro de geles 3D de matriz extracelular *in vitro*. En un modelo 3D temprano, las células endoteliales dispersadas dentro de geles de colágeno (Montesano, Orci et al., 1983) formaban redes de cables y tubos (Elsdale y Bard 1972). A pesar de que los tubos de células endoteliales exhiben la polaridad correcta, faltaban las características de la invasión y la direccionalidad (las células endoteliales fueron previamente embebidas y uniformemente dispersadas en la matriz extracelular). Sin embargo, este enfoque ha demostrado ser útil en los estudios de formación de lúmenes (Davis y Camarillo 1996) y de las respuestas de las células endoteliales a los factores de crecimiento (Madri, Pratt et al., 1988; Merwin, Anderson et al. 1990; Kuzuya y Kinsella 1994; Marx, Perlmutter et al. 1994; Davis y Camarillo 1996).

En un enfoque alternativo, cortes de 1 mm (anillos) de aorta de rata embebidos en un coágulo de plasma 3D generaron ramificación, tubos de anastomosis (Nicosia, Tchao et al. 1982). Los brotes de los anillos aórticos exhibieron invasión y direccionalidad de tipo angiogénesis además de polaridad. Se han usado modelos de explantes que utilizan anillos de aorta de ratas o segmentos microvasculares de ratones para estudiar la influencia de tumores, factores de crecimiento, diferentes soportes de la matriz extracelular y condiciones del envejecimiento sobre la angiogénesis (Nicosia, Tchao et al. 1983; Mori, Sadahira et al. 1988; Nicosia y Ottinetti 1990; Nicosia, Bonanno et al. 1992; Villaschi y Nicosia 1993; Nicosia, Bonanno et al., 1994; Nicosia, Nicosia et al., 1994; Nicosia y Tuszynski 1994; Hoying, Boswell et al. 1996; Arthur, Vernon et al. 1998).

Existe varios modelos que inducen a las células endoteliales purificadas (como monocapas o agregados) a brotar de forma invasiva en geles de matriz extracelular 3D subyacentes o circundantes (Montesano y Orci 1985; Pepper, Montesano et al. 1991; Montesano, Pepper et al. 1993; Nehls y Drenckhahn 1995; Nehls y Herrmann 1996; Vernon y Sage 1999; Vernon y Gooden 2002). Cada uno de estos modelos tiene limitaciones específicas que incluyen dificultad para visualizar la formación de brotes, germinación limitada, un requisito para el corte, o la falta de eficacia con ciertos tipos de células endoteliales.

Wolverine y Gulec han desvelado un sistema de angiogénesis 3D (US 2002/0150879 A1) que implica embeber un fragmento de tejido del tumor en una matriz. El crecimiento de microvasos puede caracterizarse por ensayar el potencial angiogénico del tejido. Sin embargo, este enfoque no proporciona perfusión luminal de los microvasos.

Neumann (el inventor aquí) et al. 2003, ha desvelado la posibilidad de crear microvasos perfundidos *in vitro* que se pueden incluir en un tejido artificial. Neumann et al. 2003 enseña el uso de una cuerda de nylon de 127 micrómetros como mandriles sostenidos por un tubo retráctil para fabricar microvasos. Los vasos se produjeron a partir de células

de músculo liso de aorta de rata incrustadas en agar. Estos microvasos eran de naturaleza exploratoria y no son adecuados para la creación de un injerto de vaso humano.

Los modelos bidimensionales de crecimiento vascular *in vitro* no establecen las características definitorias de la angiogénesis enumeradas anteriormente, mientras que los modelos 3D existentes reproducen algunas o la mayoría de las características. Es importante destacar que, ninguno de los modelos 3D disponibles actualmente reconstruyen un vaso sanguíneo principal que contiene un líquido circulatorio, presurizado, fluido. En consecuencia, ninguno de los modelos 3D *in vitro* existentes permiten el estudio de la contribución de la presión luminal y el flujo al crecimiento vascular y la morfogénesis.

Frerich et al. 2006 (Head Face Med., 16 de agosto, 2:26) se refiere a un modelo *in vitro* para un vaso de pequeño diámetro a partir de las células del estroma de tejido adiposo y células endoteliales de vena umbilical humana en un andamio de gelatina en forma de tubo.

15 Sumario de la divulgación

Las realizaciones de la invención se describen en los párrafos siguientes numerados:

(1) Un método para la creación de redes de microvasos perfundibles *in vitro*, comprendiendo dicho método:

tirar de una pluralidad de mandriles a través de una matriz para formar más de un canal a través de la matriz; inyectar células endoteliales en cada canal; incubar la matriz para permitir que las células se adhieran dentro de cada canal; perfundir cada canal para eliminar las células no fijadas y para crear un vaso parental dentro de cada canal, donde cada vaso parental incluye un canal hueco perfundible revestido de células en la matriz; en el que mediante la exposición de cada vaso parental a un compuesto seleccionado de entre factor de crecimiento de fibroblastos básico, factor de crecimiento endotelial vascular y 12-miristato-13-acetato de forbol, se induce la formación de brotes en cada vaso parental en la matriz circundante que se anastomosan para formar una red de microvasos, donde un vaso parental está conectado a través de una red de brotes con por lo menos un segundo vaso parental.

(2) El método de acuerdo con el párrafo 1, en el que la red de microvasos se somete a perfusión luminal a través de cada vaso parental, en el que un perfusado líquido es desviado a través de los capilares reduciendo la corriente en un vaso parental y aumentando la resistencia en un segundo vaso parental que está conectado al primero por uno o más brotes de manera que el perfusado es impulsado desde el vaso que tiene una presión más alta al vaso que tiene una presión más baja.

(3) El método de acuerdo con el párrafo 2, en el que el canal de perfusión emplea al menos un perfusado seleccionado del grupo que consiste en: medio de crecimiento celular oxigenado libre de suero y sustancias angiogénicas o angiostáticas y medio de crecimiento celular oxigenado suplementado con suero y/o compuestos que influyen en la angiogénesis y solución salina fisiológica oxigenada; un perfusado que comprende sangre oxigenada; un perfusado que comprende componentes de la sangre; un perfusado que comprende sustitutos de la sangre; un perfusado desoxigenado donde la oxigenación del sistema se consigue mediante la difusión a través de la matriz; un perfusado que comprende al menos uno de compuestos angiogénicos y angiostáticos.

(4) El método del párrafo 1, en el que los al menos dos vasos parentales comprenden matrices multidimensionales de los vasos perfundibles.

(5) El método del párrafo 1, en el que la matriz comprende al menos uno de compuestos angiogénicos y angiostáticos.

(6) El método del párrafo 1, en el que las células comprenden células modificadas genéticamente que liberan productos en un perfusado o en la matriz.

(7) El método del párrafo 1, en el que la matriz comprende un material seleccionado del grupo que consiste en fibrina, colágeno, gelatina, membrana basal gelificada, agar, agarosa, alginato, proteínas de la membrana basal, gel de sílice, células y combinaciones de los mismos.

(8) El método del párrafo 1, en el que las células se depositan en el canal de matriz seleccionando al menos un método de fijación previa al mandril, por inyección en el canal de la matriz después de la retirada del mandril, y por una combinación de fijación previa al mandril y también por inyección en la matriz.

(9) El método del párrafo 1, en el que el mandril se retira de la matriz por al menos un método seleccionado de extracción y descomposición.

(10) El método del párrafo 1, en el que la matriz se llena con células seleccionadas de entre el grupo que consiste en células endoteliales, células de músculo liso, pericitos, células humanas, células animales, células vegetales, células madre, células musculares, células hepáticas, células renales, células de pulmón, células de la piel, células epiteliales y células modificadas genéticamente.

(11) El método del párrafo 1, en el que un fragmento de tejido sano o enfermo está incrustado en la matriz, o en el que un fragmento de tejido canceroso está incrustado en la matriz.

(12) El método del párrafo 1 en el que las redes de microvasos están constituidas por células normales o modificadas genéticamente.

Se desvela un método para la creación de redes de microvasos perfundibles *in vitro*. Se tira de un mandril a través

de una matriz para formar un canal a través de la matriz. Las células se inyectan en el canal, el canal tiene una pared interna. Se incuba la matriz para permitir que las células se adhieran a la pared interior. El canal se perfunde para eliminar las células no fijadas para crear un vaso parental, en el que el vaso parental incluye un canal hueco perfundible revestido de células en la matriz. El vaso parental se induce para crear brotes en el gel de matriz circundante a fin de formar una red de microvasos. La red de microvasos se somete a perfusión luminal a través del vaso parental.

La presente divulgación proporciona métodos y sistemas que superan las limitaciones de los modelos existentes de la angiogénesis mediante la combinación de métodos probados para generar brotes invasivos, tubulares, microvasculares en la matriz extracelular (MEC) 3D con nuevas metodologías para la fabricación de un vaso parental de tejido artificial que será la fuente de flujo luminal. A través del perfusado, los compuestos moduladores de la angiogénesis se pueden administrar a la superficie luminal de las células endoteliales en las que se sabe que residen los receptores específicos. La presencia de un flujo luminal de medio nutritivo aumentará sustancialmente el tiempo de supervivencia de los tubos capilares *in vitro*. El sistema de la angiogénesis divulgado se puede utilizar para evaluar varios parámetros experimentales que incluyen hipoxia/hiperoxia, prueba de compuestos bioactivos solubles específicos, uso de células modificadas genéticamente y la administración de genes a través de transfección viral. El sistema permite el estudio de la angiogénesis en relación con la reparación de heridas, el envejecimiento, el cáncer y la aterosclerosis. Es importante destacar que, un modelo siguiendo las enseñanzas de la presente invención puede adaptarse para proporcionar sistemas vasculares totalmente funcionales capaces de incorporarse en los tejidos artificiales obtenidos por biotecnología.

La presente divulgación también proporciona nuevos y novedosos enfoques, incluyendo un diseño de colector para la fabricación de los microvasos, fabricación de microvasos a partir de células endoteliales y fabricación de vasos más grandes (que tienen por ejemplo el tamaño de las arterias coronarias). Estas y otras nuevas enseñanzas importantes, incluyendo, por ejemplo, un método para la creación de redes microvasculares son evidentes a partir de la memoria y reivindicaciones siguientes.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1A, la FIG. 1B y la FIG. 1C muestran esquemáticamente un ejemplo de creación de vasos parentales. La FIG. 2A, la FIG. 2B, la FIG. 2C y la Fig. 2D muestran esquemáticamente un ejemplo de un proceso termo-retráctil conocido. La FIG. 3A muestra esquemáticamente un diseño conocido para el montaje de los dispositivos de cultivo/perfusión. La FIG. 3B muestra esquemáticamente un diseño utilizado en un método de fabricación para el montaje de dispositivos de cultivo/perfusión. La FIG. 4A y la FIG. 4B muestran esquemáticamente la creación de colectores para dispositivos de cultivo/perfusión. La FIG. 5A, la FIG. 5B y la FIG. 5C muestran esquemáticamente un diseño alternativo para los dispositivos de cultivo/perfusión microfabricados. La FIG. 6 muestra esquemáticamente un procedimiento de siembra de células. La FIG. 7 muestra un esquema de una red capilar entre dos vasos parentales bioartificiales. La FIG. 8 muestra una imagen *in vitro* de un ejemplo de una pluralidad de mandriles después de la siembra con células del músculo liso. La FIG. 8B muestra un ejemplo de una placa muscular perfundida. La FIG. 9 muestra esquemáticamente un DCP alternativo. La FIG. 10 muestra brotes que crecen de un único vaso parental en la matriz circundante. La FIG. 11 muestra un vaso parental conectado a través de una red de brotes a un segundo vaso parental. La FIG. 12 muestra un método alternativo para la creación de células parentales mediante la siembra de células en canales en una matriz de colágeno.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

El método de la presente invención es útil para el estudio del crecimiento vascular fisiológico y patológico y del crecimiento vascular en respuesta a factores angiogénicos o angiostáticos. Otras aplicaciones útiles son los métodos que evalúan el potencial angiogénico de tejidos cancerosos y la respuesta a los fármacos antiangiogénicos. Además, el método de la invención puede usarse para construir varios dispositivos de curación de heridas y para la vascularización de las construcciones de ingeniería tisular.

En un ejemplo se divulga un método y dispositivo para la creación de redes de microvasos tridimensionales perfundibles. Tal como se usa en la presente memoria, "CE" se refiere a células endoteliales, "SMC" se refiere a células del músculo liso y "CAS" se refiere a sucedáneos de la arteria coronaria.

En general, los dispositivos para el cultivo y la perfusión de las redes de microvasos consisten en una cámara que aloja uno o más mandriles en el centro (como se muestra mejor en la FIG. 1). Las cámaras se pueden fabricar de cualquier material biocompatible y mediante un número de técnicas, por ejemplo, intercalando los bastidores de

corte por láser. Los mandriles se montan dentro de la cámara de tal manera que son retráctiles. Esto se puede lograr mediante el ajuste de los extremos de los mandriles en el tubo, como por ejemplo, mediante contracción con calor, (como se demuestra en la FIG. 2). El diámetro de los mandriles depende del calibre del vaso deseado. La configuración puede ser modificada para dar cabida a vasos individuales, dos vasos o una serie entera de vasos en 2D o 3D. Los mandriles pueden ser de diversos materiales, tales como fibras de polímero, fibras de vidrio, hilos o similares,

Los microvasos se crean mediante la siembra de células sobre los mandriles, estimulando las células para que se multipliquen alrededor de los mandriles y extrayendo los mandriles cuando las células han formado paredes de los vasos. Los vasos son luego embebidos en una matriz. Dependiendo de las condiciones de cultivo, la composición de la matriz y la presencia de estímulos angiogénicos (por ejemplo, factores de crecimiento), los vasos parentales brotarán en la matriz circundante. Los brotes se anastomosizarán entre sí, lo que conduce a la formación de redes capilares. Después de la separación de los mandriles, los dispositivos están conectados a un sistema de perfusión y los vasos se someten a flujo de fluido luminal.

Con referencia ahora a la FIG. 1A, la FIG. 1B y la FIG. 1C, se muestra un ejemplo esquemático de creación de vasos parentales. La FIG. 1A muestra las células endoteliales 1 en un medio de crecimiento de cultivo 100, sembradas sobre mandril 2 alojado en el tubo retráctil 4 en un cuerpo de dispositivo 3. La FIG. 1B muestra que las células 1 se han multiplicado y han formado una capa circular a modo de un manguito de células 102. La FIG. 1C muestra el manguito de células después de la extracción del mandril 2 en una matriz extracelular (MEC) de gel 110 que se perfunde con medio de crecimiento de cultivo de 100.

El método divulgado en la presente memoria comprende la fabricación de estructuras de vasos bioartificiales perfundibles para aplicaciones de ingeniería de tejidos y modelos de investigación. El principio general del método desvelado implica el cultivo de células en capas alrededor de los mandriles extraíbles que están estrechamente ajustados en un tubo de pared delgada u otros accesorios. Una vez que las capas de células han alcanzado un espesor de pared deseado, los mandriles se retiran, y los vasos bioartificiales (VBA) así creados pueden ser perfundidos con medio de cultivo, sangre, sustitutos de la sangre u otros fluidos mediante la ayuda de un sistema de perfusión. El método divulgado permite la producción de vasos sanguíneos fabricados en masa o creados a medida, modelos de angiogénesis perfundidos *in vitro*, dispositivos para la curación de heridas, componentes de tejido, tejidos y órganos enteros, así como modelos de investigación.

Fabricación de dispositivos de cultivo/perfusión

Con referencia ahora a la FIG. 2A, FIG. 2B, FIG. 2C y FIG. 2D, se muestra un ejemplo esquemático de un proceso termo-retráctil conocido. Como se muestra específicamente en la FIG. 2A cada dispositivo de cultivo/perfusión (DCP) puede comprender uno o más mandriles 2 alojados en un bastidor de soporte 12. Los mandriles 2 del diámetro del calibre del vaso deseado se ajustan firmemente en sus extremos en segmentos de tubo retráctil 4 de grado médico. Los mandriles 2 pueden comprender fibras biocompatibles (por ejemplo polímero, vidrio, alambres o equivalentes) que tienen diámetros desde varios micrómetros hasta varios milímetros, dependiendo del tamaño del vaso que se quiere emular. En un ejemplo, se empleó como mandriles el tubo microcapilar que comprende fibras ópticas.

Como se muestra en el dibujo más detallado de la FIG. 2B, una parte central 14 de cada segmento de tubo retráctil 4 es termo-retraído alrededor de uno de los mandriles 2. Posteriormente, como se muestra específicamente en la FIG. 2C, el mandril 2 se retrae y el tubo se corta. La FIG. 2D muestra la situación después de cambiar la posición del mandril de tal manera que ambos extremos del mandril están encerrados por el segmento de tubo 4 retraído ahora cortado y separado. Los bastidores 12 se pueden fabricar utilizando diversos materiales y técnicas. La configuración puede ser modificada para acomodar vasos bioartificiales individuales o conjuntos de vasos bioartificiales. De manera similar, depositando varios planos de series de mandril, se puede generar un tejido perfundible grueso con redes vasculares.

Mecanizado de cámaras de perfusión

El método de la invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Con referencia ahora a la FIG. 3A, también se divulga en la presente memoria, pero no se reivindica, una configuración conocida para la perfusión de varios conjuntos de mandril/tubo retráctil 11. También se divulga pero no se reivindica el bastidor 20 que puede ventajosamente ser fresado a partir de policarbonato o materiales equivalentes. Las cámaras de distribución 30 pueden ser incluidas en el diseño, lo que permite la perfusión simultánea de muchos vasos bioartificiales. Los extremos de un conjunto de hilos que comprenden los mandriles 2 se recogen en un tubo de silicona 23.

Corte por láser de bastidores de Mylar

Con referencia ahora a la FIG. 3B se muestra esquemáticamente un diseño novedoso usado en un método de fabricación para el montaje de dispositivos de cultivo/perfusión. Un diseño de un único vaso, DCP 70, puede ser ventajosamente creado intercalando un mandril 2 alojado en un tubo termorretráctil 4 entre dos bastidores Mylar® 22

cortados con láser. Un colector 21 epoxi cilíndrico, construido como se detalla a continuación, se puede usar ventajosamente para alojar el conjunto del mandril/tubo retráctil 11.

5 Los conjuntos de mandril/tubo retráctil se pueden intercalar entre dos bastidores de una película de poliéster o similares, tales como Mylar®, con los lados adhesivos presionando entre sí de tal manera que cada mandril está suspendido en la ventana del bastidor 76 por dos segmentos de tubo retráctil 4' en cada extremo. Los dos segmentos de tubo retráctil 4' están estabilizados y reforzados por la inclusión de al menos un alambre de estabilización 26 delgado en el bastidor 22 y por encapsulación en colectores epoxi cilíndricos que se proyectan en torno al tubo retráctil y el al menos un alambre de estabilización 26 mediante el uso de un molde de tubo de silicona.
10 Los dos segmentos de tubo retráctil 4' con el tiempo se convertirán en los puertos de entrada y salida del DPC 70.

Con referencia ahora a la FIG. 4A y la FIG. 4B, se muestra esquemáticamente un método para la creación de colectores para dispositivos de cultivo-perfusión. La FIG. 4A muestra particularmente una pluralidad de conjuntos de tubo retráctil/mandril 11 que sobresalen de un manguito de, por ejemplo, un tubo de silicona 50. Un pegamento epoxi 40 se inyecta para llenar el tubo de silicona 50 y se deja endurecer.
15

La FIG. 4B muestra especialmente el estado después de que el pegamento epoxi 40 se haya endurecido y el tubo de silicona 50 se deje abierto y se retire. Lo que resta es una barra de epoxi 44 endurecida. La barra de epoxi 44 se corta después de que los mandriles se han retraído por detrás del punto de corte dejando canales 42 creados por el tubo retráctil. Los extremos 46 de muchos tubos retráctiles pueden estar integrados para formar un colector 21. La colocación de DCP individuales o conjuntos de bastidor DCP se puede utilizar para crear conjuntos de vasos 3D.
20

Métodos alternativos

25 Con referencia ahora a la FIG. 5A, FIG. 5B y FIG. 5C se muestra esquemáticamente un diseño alternativo para los dispositivos de cultivo/perfusión microfabricados. La FIG. 5A en particular muestra un conjunto de mandriles 2 introducidos a través de pequeñas perforaciones 54 en un bastidor donde las perforaciones tienen manguitos 56, que sustituyen al tubo retráctil. La FIG. 5B muestra particularmente un DCP antes de la siembra de células que incluye un conjunto de mandriles 2 montados en una pared del bastidor 52.
30

La FIG. 5C muestra particularmente un ejemplo alternativo de un dispositivo de cultivo/perfusión con vasos colectores 62, donde los colectores microfabricados 64 se pueden unir a los manguitos 56 en la parte exterior del bastidor 52. Los vasos 62 se cultivan en mandriles como se muestra en la presente memoria y permanecen después de que los mandriles se retiran. Se pueden utilizar métodos de microfabricación, tales como macromoldeo, para la producción en masa de tales conjuntos de bastidor de DCP.
35

Creación del vaso y perfusión

40 Con referencia ahora a la FIG. 6 se muestra esquemáticamente un procedimiento de siembra de células. Con el fin de preparar los DCP 70 para la siembra de células, se limpian primero y después se esterilizan por radiación UV. En condiciones estériles, los DCP se fijan a una superficie, por ejemplo, la parte inferior de la placa de Petri 72. La ventana interior 76 (como se muestra en la FIG. 3B) del conjunto de bastidor DCP 70 se llena a continuación con una solución que contiene una proteína de unión, tal como la laminina-1. Se pueden utilizar uno o más separadores 77 según sea necesario. Después de un período de incubación, se retira la solución que contiene la proteína de unión y a continuación se transfiere una suspensión del tipo celular deseado (por ej., células de músculo liso o células endoteliales) en el medio de cultivo a la ventana 76 del DCP 70.
45

La siembra de células se puede realizar llenando un volumen de suspensión celular en la ventana y dando la vuelta al conjunto de bastidor del DCP 70 boca abajo, creando así una gota colgante 80. Durante un período de incubación de aproximadamente 45 min, un gran número de células se fijarán al conjunto mandril/tubo retráctil dentro del conjunto de bastidor de DCP. El exceso de células se hundirá en la punta de la gota colgante y se puede recoger y desechar fácilmente. La placa de Petri, que contiene uno o más conjuntos de bastidor de DCP, se devuelve entonces a la posición vertical, llenada con medio de cultivo hasta que los conjuntos de bastidor del DCP se inundan, y se incuban. Las condiciones de incubación en un ejemplo estaban en un ambiente de CO₂ 5 % a 37 °C.
50 Las células fijadas al conjunto mandril/tubo retráctil se extenderán y se multiplicarán, formando monocapas concéntricas (por ejemplo, células endoteliales) o multicapas de 150 μm y más de grosor (por ejemplo, células de músculo liso).
55

En la configuración o grosor de pared deseados se extraen los mandriles, creando de ese modo tubos celulares huecas. Las paredes más delgadas pueden ser protegidas de la rotura por colada de un gel tal como, por ejemplo, agarosa, colágeno, un gel de proteínas de membrana basal o similares, alrededor de los manguitos de células antes de la extracción del mandril. Los colectores de los conjuntos de bastidor de DCP se conectan a un sistema de perfusión y se perfunden con el fluido de elección, tal como medio de crecimiento.
60

65 En otra realización, un método para la creación de vasos "parentales" endoteliales a partir de células endoteliales vasculares humanas (CEVHU) comprende las etapas en las que:

El dispositivo de cultivo se limpia primero y luego se esteriliza por exposición UV durante 30 minutos, de cada lado. En condiciones estériles, el dispositivo se fija a la parte inferior de una placa de Petri con tiras estériles.

5 La ventana interior del dispositivo se llena a continuación con una solución de fijación de proteínas de laminina-1 (se pueden utilizar en su lugar otras proteínas de unión, tales como fibronectina, fibrina o gelatina).

Después de la incubación durante la noche, se retira la solución que contiene la proteína de unión y a continuación se transfiere una suspensión de células endoteliales vasculares humanas en medio de cultivo a la ventana del dispositivo.

10 A continuación, la placa de Petri se da la vuelta, creando así una gota colgante de la suspensión de medio celular en la ventana del dispositivo. Después de un período de incubación de 45 min en una incubadora de cultivo celular (CO₂ 5 %, 37 °C), se fijarán un gran número de células al conjunto mandril/tubo retráctil dentro de los dispositivos.

15 La placa de Petri se lleva entonces de nuevo a la posición vertical y se llena con medio de crecimiento para células endoteliales vasculares humanas hasta que el dispositivo queda sumergido.

20 Las células no fijadas a los mandriles flotarán fuera y pueden ser aspiradas y desechadas.

La placa de Petri se coloca entonces en una incubadora (CO₂ 5 %, 37 °C). Las células fijadas a los mandriles se extienden y se multiplican, formando monocapas concéntricas de células endoteliales vasculares humanas.

25 El medio de cultivo se retira a continuación de la placa de Petri. Una solución de colágeno se llena en la ventana del dispositivo de cultivo y se deja que solidifique, incorporando así el mandril con la capa de células.

30 Las células endoteliales vasculares humanas formarán brotes en el gel de colágeno. Los mandriles se extraen a continuación lentamente, dejando atrás un microvaso "parental" perfundible de células endoteliales vasculares humanas.

Los colectores del dispositivo se conectan a continuación a un sistema de perfusión y se perfunden con medio de crecimiento de células endoteliales vasculares humanas.

Sistema de perfusión

35 Los DCP pueden estar unidos a sistemas de perfusión, ya sea en forma lineal o en modo circulatorio. Una configuración lineal puede ser creada con un sistema de flujo por gravedad o una bomba de la jeringa comercializada o hecha a la medida. Las jeringas se llenan con medio de perfusión, se montan en la bomba de la jeringa y se conectan a los extremos aguas arriba de los DCP a través de tubos estancos a los gases. Los DCP pueden ser almacenados en una incubadora en condiciones estériles o dentro del DCP puede establecerse un entorno de cultivos de células estéril. El colector de aguas debajo de los DCP se conecta a los depósitos terminales que recogen el perfusado. Se puede construir un sistema circulatorio mediante el uso de una bomba peristáltica. Ambos, el sistema lineal y circulatorio pueden estar equipados con dispositivos para el intercambio de gases. La concentración de gas, la presión de perfusión, el flujo, la temperatura y la concentración de nutrientes y subproductos metabólicos se miden con sensores. Los datos recogidos pueden ser alimentados en un bucle de retroalimentación, lo que permite un control estricto de los parámetros deseados.

Aplicaciones específicas

50 *Modelos para la investigación relacionada con la angiogénesis*

Con referencia ahora a la Fig. 7, la FIG. 7 muestra un esquema de una red capilar entre dos vasos parentales 200, 202 bioartificiales. El perfusado líquido 204 es desviado a través de los capilares 206 disminuyendo la corriente (f) en el vaso parental "venoso" 202 y aumentando la resistencia (R) en el vaso parental "arterial" 200. En consecuencia, el perfusado 204 es impulsado desde el vaso con mayor presión hasta el vaso con la presión más baja, simulando el flujo natural de la sangre desde el extremo arterial hasta el extremo venoso del lecho capilar.

60 El método de mandriles también puede utilizarse para el desarrollo de modelos para la investigación de la angiogénesis, según sea necesario para las pruebas y la investigación farmacéutica y en la reparación de heridas, el envejecimiento y las enfermedades como el cáncer, la diabetes, la artritis y la psoriasis. Usando células endoteliales solo, o combinaciones de células endoteliales, células de músculo liso y pericitos, se pueden cultivar microvasos (MVB) bioartificiales parentales alrededor de los mandriles de micrómetros de diámetro y embeberse en un gel de apoyo de la matriz extracelular. A continuación, se extraen los mandriles, dejando atrás tubos de células endoteliales permeables dentro del gel 210 de la matriz extracelular. La extracción puede hacerse a mano, o con ayuda de un dispositivo automatizado y con velocidades que varían de extremadamente lento a extremadamente rápido. Otras variaciones pueden incluir la extracción del mandril de los microvasos bioartificiales en un estado congelado, el

revestimiento de los mandriles con un polímero termosensible o tirar de ambos extremos del mandril y de ese modo adelgazándolo hasta la ruptura.

5 El brote de los vasos parentales en el gel 210 circundante será inducido por los compuestos, seleccionados a partir del factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y 12-miristato-13-acetato de forbol (PMA), que son añadidos al perfusado gel y/o líquido (por ejemplo, medio de crecimiento).

10 Se pueden crear redes capilares 222 complejas mediante el establecimiento de una diferencia de presión entre dos microvasos bioartificiales parentales adyacentes, limitando así el flujo de sangre arterial y venosa. El flujo de líquido será redireccionado desde el microvaso bioartificial "arterial" a través de los brotes interconectados al microvaso bioartificial "venoso".

15 El perfusado puede comprender ventajosamente medio de crecimiento celular oxigenado, libre de suero y sustancias angiogénicas o angiostáticas. En otro ejemplo, el perfusado puede ser un medio de crecimiento celular oxigenado, suplementado con suero y/o compuestos que influyen en la angiogénesis. En otro ejemplo de realización, el perfusado puede ser una solución salina fisiológica oxigenada. En otro ejemplo, el perfusado puede incluir sangre oxigenada, componentes de la sangre o sustitutos de la sangre. En otro ejemplo de realización, el perfusado puede no ser oxigenado y la oxigenación del sistema se consigue mediante la difusión a través de la matriz. En otro ejemplo más de realización se pueden añadir al perfusado compuestos angiogénicos o angiostáticos.

20 En un ejemplo de realización preferida, los compuestos angiogénicos y angiostáticos o similares también se añaden a la matriz. En otro ejemplo más de realización, las células comprenden células modificadas genéticamente que liberan productos en un perfusado o en la matriz. En otro ejemplo más de realización, la matriz puede comprender, ventajosamente, fibrina, colágeno, matrices de membrana basal y gelatina. Un tipo de matriz útil es Matrigel® gel. En otro ejemplo de realización, la matriz puede comprender agar, agarosa, alginato, o gel de sílice.

30 En el método divulgado en las reivindicaciones adjuntas, las células son células endoteliales. También divulgado en la presente memoria pero no reivindicado, las células se pueden seleccionar del grupo que consiste en células endoteliales, células de músculo liso, pericitos, células humanas, células animales, células vegetales, células madre, células musculares, células hepáticas, células renales, células pulmonares, células de piel, células epiteliales y células modificadas genéticamente. Del mismo modo, la matriz puede ser poblada con células seleccionadas del grupo que consiste en células endoteliales, células de músculo liso, pericitos, células humanas, células animales, células vegetales, células madre, células musculares, células hepáticas, células renales, células pulmonares, células de la piel, células epiteliales y células modificadas genéticamente, ya sea dispersas en la matriz o localmente concentradas. En algunos casos un fragmento de tejido sano o enfermo, tal como el tejido canceroso está embebido en la matriz.

40 El brote que se origina a partir de los vasos padre se puede estudiar microscópicamente in vitro, en material de corte o en preparaciones de montaje completo. La perfusión de los microvasos bioartificiales con soluciones fluorescentes (por ejemplo dextranos fluorescentes) ayuda al análisis del diámetro del brote, la permeabilidad de los lúmenes del brote, y el grado de anastomización. La reconstrucción 3D de morfologías de brotes puede ser realizada por apilamiento en el eje z de imágenes de epifluorescencia tomadas por un microscopio confocal. La síntesis de una matriz de membrana basal pericelular por brotes 220 puede ser controlada en preparaciones completas y en cortes histológicos (parafina) por inmunomarcaje con anticuerpos anti-laminina y anticuerpos primarios anti-colágeno de tipo IV y anticuerpos secundarios fluorescentes o marcados con peroxidasa.

50 En brotes compuestos de CE/CML, las relaciones espaciales entre los dos tipos de células pueden ser examinadas mediante el marcado de las células endoteliales con un anticuerpo monoclonal (MAb) marcado con FITC para CD31 humano (clon P2B1 - Chemicon) o FITC-aglutinina UEA 1, un marcador específico de las células endoteliales humanas. Las células del músculo liso se pueden marcar con MAb anti-actina alfa-SM humana seguido de segundos anticuerpos anti-ratón-RITC. Los detalles de la estructura luminal y la interacción entre las células endoteliales y las células de músculo se pueden obtener a partir de cortes de parafina marcados con los reactivos anteriormente mencionados.

55 Los métodos de fabricación descritos son la base para la producción en masa comercial de dispositivos de angiogénesis con una alta capacidad de repetición. Con la conservación adecuada (por ejemplo almacenamiento criogénico), podrían ponerse a disposición para la venta para los investigadores vasos parentales pre-cultivados o redes capilares enteras.

60 *Sucedáneos de la arteria coronaria*

65 Para la creación de sucedáneos de la arteria coronaria, se utilizan mandriles con un diámetro exterior seleccionado para producir un sucedáneo de la arteria coronaria que tiene un lumen de vaso con un diámetro interior de aproximadamente 4 mm a 5,5 mm. Opcionalmente, el mandril puede ser un tubo hueco que se perfunde y es lo suficientemente permeable para permitir el intercambio de nutrientes y gases durante el período de crecimiento del

sucedáneo de la arteria coronaria. Los sucedáneos de la arteria coronaria pueden ser cultivadas, o bien únicamente a partir de células de músculo liso, presentando así un análogo de la estructura de la capa media de los vasos sanguíneos, o bien como estructuras compuestas de dos o tres tipos de células.

5 En el método divulgado en las reivindicaciones adjuntas las células son células endoteliales. También se divulga aquí, pero no se reivindica, un método en el que se siembran células de músculo liso en los mandriles y se hacen crecer a las capas circulares de 300 a 400 μm . Con el fin de acelerar la creación de sucedáneos de la arteria coronaria, el fenotipo de las CML se puede manipular de tal manera que las células son de un fenotipo altamente proliferativo durante la fase de crecimiento inicial, y luego se cambia a un estado diferenciado después de que la pared del vaso ha alcanzado el espesor deseado. El cambio de fenotipo provocará una ralentización drástica de la tasa de crecimiento de la célula del músculo liso e inducirá la producción de proteínas de la matriz extracelular, como el colágeno y la elastina, lo que afecta a las propiedades mecánicas de los vasos. El cambio de fenotipo se puede lograr mediante el control de la expresión de ciertos genes. Por ejemplo, con la ayuda de un promotor sensible a tetraciclina, la expresión génica (por ejemplo, para la elastina) puede ser suprimida hasta que la pared del vaso ha alcanzado el espesor deseado. La omisión de tetraciclina del medio de crecimiento activará el gen insertado. La sobreexpresión de la elastina, por ejemplo, inhibe además la proliferación celular y ejerce funciones estructurales y de señalización dentro de la pared del vaso. El acondicionamiento mecánico, por ejemplo, mediante flujo pulsátil, puede utilizarse para reforzar los sucedáneos de la arteria coronaria, e inducir la alineación fisiológica de las células. Potencialmente se pueden utilizar también otros "cambios de fenotipo" externos o internos.

10 Las células endoteliales se pueden sembrar en los manguitos de las CML, ya sea directamente después de la extracción de los mandriles, o después del acondicionamiento y reestructuración de las células de músculo liso. La siembra de células endoteliales puede realizarse por infusión de una suspensión de células endoteliales en el manguito de las CML. El flujo se detiene entonces durante un periodo de tiempo adecuado para permitir la unión adecuada de las células endoteliales. Si es necesario, los vasos se pueden girar, o invertir varias veces con el fin de facilitar una distribución uniforme de las células endoteliales.

15 Opcionalmente, las células endoteliales se pueden sembrar primero sobre el mandril. En ese caso, las células de músculo liso se siembran en una capa de células endoteliales confluentes. En este método, será necesario evitar que las células endoteliales migren hacia la periferia del sucedáneo de la arteria coronaria, que es más rico en oxígeno y nutrientes.

20 Si se desea, la siembra de células de fibroblastos en el exterior de los manguitos de las CML puede crear una capa adventicia.

25 Las células para la creación de sucedáneos de la arteria coronaria se pueden derivar de material autólogo, heterólogo o xenogénico. Las células pueden ser células madre, células precursoras o células diferenciadas. Las células se pueden modificar genéticamente para lograr un fenotipo específico o para reducir la respuesta inmunitaria del organismo hospedador.

30 El método del DCP divulgado en la presente memoria ofrece la opción para la producción en masa para la venta de sucedáneos de vasos o sucedáneos de vasos que están diseñados a medida para el destinatario. El método del DCP divulgado en la presente memoria, también es adecuado para el desarrollo de modelos para la ingeniería de tejidos de sucedáneos de la arteria coronaria, para la investigación en la aterogénesis, arteriogenesis, para la investigación en la interacción de los diferentes tipos de células vasculares entre sí y con los componentes de la matriz extracelular, para estudios sobre los efectos del óxido nítrico y para el estudio de diversas sustancias farmacéuticas.

35 *Vasos sanguíneos y linfáticos de diferente tamaño o tipo*

El método del DCP divulgado en la presente memoria se puede usar para crear vasos sanguíneos de diámetro y tipo distinto del de las arterias coronarias. Al cambiar el diámetro del mandril variará el diámetro del vaso. El tipo de vaso (arterial, venoso, linfático) puede variarse con el fenotipo de las células y/o el punto temporal tiempo cuando se inhibe la proliferación de las células. Las venas, por ejemplo, contienen solo una pequeña capa de células del músculo liso.

40 *Otros tejidos de tipo tubular similares*

El método del DCP divulgado en la presente memoria se puede usar para fabricar otros tejidos tubulares, tales como el conducto biliar, el conducto lagrimal, la trompa de Eustaquio, el oviducto, los conductos deferentes, los uréteres, la uretra, las vías respiratorias pulmonares, etc. El método del DCP divulgado en la presente memoria también puede resultar útil para la generación de conductos nerviosos a partir de diferentes tipos de células, incluyendo células gliales, para la orientación del crecimiento y la reparación neural.

45 *Sistemas de VBA sistemas para la ingeniería de tejidos*

El método del DCP divulgado en la presente memoria puede ser utilizado para la ingeniería de tejidos y órganos mediante el uso de matrices de mandriles extraíbles como andamio. Las células del tejido/órgano deseado (músculo, hígado, riñón, pulmón, piel, etc.) se siembran en los mandriles recubiertos de proteína de unión. Estos mandriles pueden estar hechos de fibras sólidas o alambres, o, de forma alternativa, de tubos permeables al perfusado, como

5 celulosa. Los mandriles están separados unos de otros a una distancia precisa que permite la fusión de los manguitos de células individuales. Con este método, se pueden formar hojas o bloques de tejido. Los mandriles se extraen a continuación (o de otra manera se extraen) y el tejido bioartificial se perfunde internamente mediante la ayuda de un sistema de perfusión.

10 *Dispositivo para la cicatrización de heridas*

Se pueden usar sistemas de vasos bioartificiales prefabricados para facilitar la curación de heridas, tales como para las úlceras crónicas en pacientes diabéticos. Las redes capilares bioartificiales podrían embeberse en parches de materiales de apoyo (por ejemplo, de geles de matriz extracelular, enriquecidos con factores de crecimiento angiogénico) y colocarse sobre la herida. El vaso bioartificial, perfundido autónomamente con soluciones de nutrientes oxigenados, facilitaría el surgimiento de la vasculatura del donante y de la piel. De forma alternativa, un parche de vaso bioartificial tal podría intercalarse entre la herida y un injerto de piel, y facilitar el crecimiento en el injerto.

20 *Dispositivo de terapia génica*

Los vasos bioartificiales se podrían utilizar para los dispositivos de administración de fármacos implantables. Las células, tomadas de un paciente, podrían ser modificadas genéticamente *in vitro* para producir una determinada proteína (hormona, enzima, etc.). Estas células pueden crecer a continuación en vasos bioartificiales o redes vasculares, utilizando el método antes mencionado. Reimplantados en el hospedador, las células siguen produciendo la sustancia diana y la liberan de forma local o sistémica.

Tejidos y órganos artificiales

30 Se pueden utilizar redes vasculares de ingeniería tisular, como se describe anteriormente, para la creación de tejidos, o incluso órganos enteros. Un enfoque es la creación de uno o más vasos parentales perfundidos *in vitro*. Las células del estroma del tejido u órgano deseado se siembran alrededor de los vasos parentales, como por ejemplo, en un gel. A las células del estroma se suministran nutrientes y oxígeno a través de los vasos parentales. Cuando las células del estroma se multiplican, la demanda de nutrientes y oxígeno aumenta. Las células liberan

35 factores angiogénicos y estimulan el brote de los vasos. El sistema de vasos brota en la misma proporción en la que el tejido crece de forma muy parecida a la del crecimiento natural. Por lo tanto, este sistema sería también un buen modelo para los estudios de la biología del desarrollo.

Otro enfoque utiliza matrices paralelas de mandriles como un andamio para las células del estroma. A medida que las células del estroma se multiplican, las capas de células se forman alrededor de los mandriles. Eventualmente, el espacio entre todos los mandriles se llena de células del estroma, lo que tiene como resultado una hoja de tejido. Tras la retirada de los mandriles, el tejido puede ser perfundido a través de los canales dejados por los mandriles. Estos canales pueden endotelizarse a través de la siembra luminal. El enfoque no se limita a 2D. Se pueden apilar varias hojas o se pueden usar andamios 3D. El presente inventor ha utilizado matrices 2D, así como matrices en 3D para la ingeniería de tejido muscular.

En otro enfoque más, las capas de tejido y las capas de redes vasculares podrían ser creadas de forma independiente y, a continuación apilarse de forma intermitente. Todos estos enfoques pueden producir cualquiera de los modelos simples con uno o dos tipos de células, o construcciones más bien complejas compuestas de varios tipos de células.

Tras la implantación, los tejidos u órganos, diseñados con estos métodos podrían ser conectados directamente a los flujos de sangre, o mantenerse perfundidos por un sistema de perfusión hasta que la vasculatura del hospedador haya crecido en el injerto.

55 **Ejemplo de construcción de músculo fabricado con tejido perfundido**

Haciendo referencia ahora a la FIG. 8a, se muestra una imagen *in vitro* de un ejemplo de una pluralidad de mandriles después de la siembra con las células del músculo liso. En el método divulgado en las reivindicaciones adjuntas las células son células endoteliales. También divulgado en la presente memoria, pero no reivindicado, es un método en el que se intercala una pluralidad de unidades de mandril M y tubo retráctil intercaladas en un bastidor de Mylar®. La distancia entre los mandriles M se ajustó a aproximadamente 100 μm . Los extremos de todos los segmentos de tubo retráctil se combinaron en un colector aguas arriba y uno aguas abajo (no mostrados). El bastidor de Mylar se esterilizó, se recubrió con laminina y se sembró con una suspensión de 5×10^6 células de músculo liso ML de aorta de rata (RASMCs)/ml. Las células SM se unieron a cada mandril M individual y se multiplicaron, formando de esta manera capas circulares. Después de 10 días, las capas individuales se habían

fundido y dieron lugar a una hoja o placa gruesa de células de músculo liso. Después de 7 días adicionales en medio de crecimiento, el medio fue suplementado con 50 U/ml de heparina durante otros 7 días. A continuación, se extrajeron todos los mandriles y el tejido se perfundió con medio con heparina a una velocidad de 10 ml/día. La cámara de perfusión se mantuvo fija a la parte inferior de una placa de Petri de 100 mm llena de medio con heparina. La placa de CML se perfundió durante 11 días. Durante ese tiempo, los canales CH permanecieron funcionales y claramente visibles in vitro (como se muestra mejor en la Fig. 8b).

Haciendo referencia ahora a la FIG. 8b, se muestra un ejemplo de una placa de músculo PM perfundida. El fluido es mostrado perfundido a través de los extremos del tubo (T) en los canales (CH) dejados por los mandriles extraídos.

Haciendo referencia ahora a la FIG. 9, se muestra esquemáticamente una realización alternativa de un DCP. En el ejemplo, un DCP 900 incluye una capa 902 yuxtapuesta entre un primer porta de vidrio 904 y un segundo porta de vidrio 920. La capa 902 tiene un espesor adecuado para la incorporación de una pluralidad de puertos de fluido conectados por canales 922. La pluralidad de orificios de fluido incluye un puerto de suspensión de células 914, una pluralidad de puertos de entrada 912 y una pluralidad de puertos de salida 918. Los puertos que están conectados por canales 922 para permitir el paso y el intercambio de fluidos funcionan de manera similar. Múltiples puertos, como los puertos 912, están dispuestos para proporcionar múltiples puntos de acceso. Otras aplicaciones pueden emplear ventajosamente diseños de microfluidos con cámaras de fluido y puertos creados en materiales de microfluidos. Del mismo modo, la capa puede comprender silicona u otros materiales adecuados para su uso en la microscopía de aplicaciones de microfluidos. Una cámara de colágeno 906 se encuentra ventajosamente localizada para el acceso de un par de tubos capilares 916 huecos, flexibles. El número de tubos capilares empleados puede variar de uno a sustancialmente más de dos, ya que pueden ser acomodados por el tamaño del DPC y el número de vasos que se crean. Se puede acceder a cada uno de la pluralidad de los puertos y las cámaras a través de la capa mediante una o más bombas de jeringa a través de entradas de tubos 940A, 940B, donde las bombas de jeringa están asociadas a las jeringas que tienen agujas. Aunque solo dos entradas de tubos de la bomba de la jeringa 940A, 940B se muestran para simplificar los dibujos, se comprenderá que se pueden usar bombas de jeringa individuales, jeringas o equivalentes para inyectar o extraer material en cada cámara y/o puerto según el caso. En una realización, las bombas de jeringa están acopladas a jeringas estancas a los gases.

Habiendo descrito las características de un DCP 900 alternativo, que ayudará a la comprensión de la divulgación, ahora se describirá un método para la construcción del DCP. En un ejemplo que empleo una capa de silicona para la capa 902, se perfora un patrón de agujeros y canales en una capa de silicona cubierta con una capa superior adhesiva 943 y una capa inferior adhesiva 945. A continuación, se introducen agujas huecas a través de la silicona, que luego se utilizarán para guiar los capilares 916 de sílice fundido recubiertos de poliamida en la cámara de colágeno 906 y también en uno de los orificios de entrada 912. Los dos tubos capilares están alojados en un tubo 910 de pequeño calibre, que va desde la cámara principal hasta los orificios de salida 907. La capa de silicona 902 se intercala entonces entre dos portaobjetos de vidrio con la ayuda de las capas adhesivas. El DCP 900 se esteriliza en el autoclave y se almacena hasta su uso. Para obtener la cámara 906 lista para la creación de vasos, se prepara una solución de colágeno, se inyecta a través de una aguja de la jeringa directamente en la cámara de colágeno 906 y se deja que forme un gel en una incubadora durante la noche. El DCP 900 se conecta a continuación a una bomba de la jeringa mediante la inyección de agujas de jeringa en los dos orificios de entrada.

Las agujas de las jeringas se conectan, a su vez, a un tubo estanco a los gases, que conduce a dos jeringas estancas a los gases, llenas de medio de cultivo con pH bien ajustado bien y montadas en una bomba de la jeringa. Los dos orificios de salida 908A, 908B están conectados a los depósitos de residuos de manera similar. Las bombas de jeringa operan aquí como bombas de perfusión, se activan a continuación, llenando por lo tanto los orificios de entrada y cebando secuencialmente los orificios de entrada, los tubos capilares y los puertos de salida. Cuando todo el aire es empujado fuera del sistema, se sujeta cada tubo capilar con unas pinzas y se tira hacia atrás de los extremos que llegan a la cámara de colágeno a través del gel de colágeno hasta que solo los extremos de los capilares llegan a la cámara de matriz. Con este procedimiento, se crean dos canales perfundibles en el gel de colágeno. Con el fin de sembrar células en los canales de colágeno, se inyecta una suspensión altamente concentrada de células endoteliales en los puertos para la suspensión de células. La bomba de la jeringa se apaga a continuación y los otros extremos de los capilares son estirados hacia los depósitos pequeños 914R que contienen las células, lo que conduce a una afluencia inmediata de grandes números de células en los canales de colágeno. El caudal de las células puede ser estrechamente controlado a través de la altura de los depósitos de residuos. A continuación, el DCP se coloca en una incubadora durante 45 min para permitir que las células se adhieran a las paredes de los canales de colágeno. El DPC se puede invertir varias veces o manipularlo de otro modo para distribuir las células de manera óptima. Por último, los tubos capilares se retiran de los depósitos de células en los depósitos que forman parte del puerto de entrada y la bomba de la jeringa se enciende y se establece la velocidad de perfusión deseada. El exceso de células se lava. Este procedimiento de siembra conduce a dos vasos parentales con monocapas homogéneas de células después de permitir tiempo para el crecimiento, donde el tiempo requerido es más corto para grandes concentrados de células inyectadas en los tubos. Tenga en cuenta que el mandril puede ser retirado de la matriz por extracción y/o descomposición, dependiendo del tipo de mandril utilizado.

Con referencia ahora a la FIG. 10, se muestra un único vaso parental 1050 del que crecen brotes 1052 en una matriz 1054 circundante. Cuando se siembran células de la vena del cordón umbilical humano (HUVEC) en los

canales de colágeno, los vasos parentales así creados comienzan a brotar en el colágeno. Estos brotes se alargan y comienzan a ramificarse. Estas ramas finalmente anastomizan con ramas del vaso parental opuesto y, por lo tanto, forman redes vasculares.

- 5 Con referencia ahora a la FIG. 11, un primer vaso parental 1102 se muestra conectado a través de una red de brotes 1106 a un segundo vaso parental 1104. Los brotes 1106 tienen lúmenes y son perfundidos.

Protocolo para la creación de vasos parentales

- 10 Haciendo referencia ahora a la FIG. 12, se muestra un método alternativo para la creación de células parentales mediante la siembra de canales en una matriz de colágeno. Habiendo descrito el DCP alternativo utilizando una capa de silicona, ahora se describirá un ejemplo específico de una aplicación para la creación de un sistema de microvasos para facilitar la comprensión de la divulgación por los expertos en la técnica.

- 15 El DCP se esteriliza en un autoclave y se mantiene en un ambiente estéril hasta su uso. Se prepara una solución de colágeno y se mantiene en hielo. El colágeno se llena en una jeringa pequeña. La jeringa está provista de una aguja de jeringa 30G y la solución de colágeno se inyecta en la cámara de colágeno a través de la aguja de la jeringa hasta que la cámara está completamente llena de colágeno 1002. Una segunda aguja de la jeringa se inyecta desde el lado opuesto de la cámara como una salida de aire.

- 20 El DCP se conecta entonces a una bomba de la jeringa mediante la inyección de agujas de jeringa en los dos orificios de entrada 1004. Las agujas de las jeringas son, a su vez, conectadas a un tubo estanco a los gases, que conduce a dos jeringas herméticas a los gases, llenas de medio de crecimiento con pH bien ajustado y montadas en la bomba de la jeringa. Los dos puertos de salida están conectados a los recipientes de residuos de manera similar (es decir, agujas de jeringa inyectadas en los puertos de salida, conduciendo los tubos a los contenedores de residuos 1006.

- 30 El DCP se perfunde haciendo funcionar la bomba de la jeringa como una bomba de perfusión, llenando de esta manera los orificios de entrada y cebando secuencialmente los puertos de entrada, los tubos capilares y los puertos de salida 1008. Cuando todo el aire es empujado fuera del sistema (por ejemplo, a través de agujas de jeringas de diámetro pequeño que sirven como salidas de aire removibles), entonces se sujeta cada tubo capilar con unas pinzas y se tira hacia atrás de los extremos que llegan a la cámara de colágeno a través del gel de colágeno hasta que solo los extremos de los capilares llegan a la cámara. Con este procedimiento, se crean dos canales perfundibles en el gel de colágeno 1010.

- 35 Con el fin de sembrar células en los canales de colágeno, se inyecta una suspensión altamente concentrada de células endoteliales en los puertos para la suspensión de células 1012. La bomba de la jeringa se apaga a continuación y los otros extremos de los capilares son estirados desde los puertos de entrada hasta los depósitos pequeños contienen las células, lo que conduce a una afluencia inmediata de grandes números de células en los canales de colágeno 1014. El caudal de las células puede ser estrechamente controlado a través de retropresión (altura de los depósitos de residuos). A continuación, los capilares son estirados más hacia los depósitos que están conectados con los puertos de entrada.

- 45 A continuación, el DCP se coloca en una incubadora durante 45 min para permitir que las células se adhieran a las paredes de los canales de colágeno 1016. El DCP se puede invertir varias veces o manipularlo de otro modo para distribuir las células de manera óptima.

- 50 Por último, se enciende la bomba de la jeringa y se ajusta a una velocidad de perfusión 1020 deseada. El exceso de células se lava. Este procedimiento de siembra conduce a dos vasos parentales con monocapas homogéneas de células 1022. Una o más redes de microvasos pueden crearse mediante la perfusión de los vasos parentales como se ha descrito anteriormente.

- 55 En otra alternativa, el procedimiento para crear los vasos parentales también puede incluir la incrustación de mandriles en la matriz de colágeno, la extracción de los mandriles y la infusión de las células en los canales dejados por los mandriles, así como la siembra de células en los mandriles como se ha descrito anteriormente con referencia a la FIG. 1A-1C y otros. La combinación de los dos métodos permite la estratificación de diferentes tipos de células.

Referencias

- 60 Akhtar N, Dickerson EB, Auerback R. 2002. The sponge/Matrigel angiogenesis assay. *Angiogenesis* 5:75-80
 Algire GH, Chalkley HW, Legallais FY, Park HD. 1945. Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. I. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants. *J Natl Cancer Inst* 6:73-85.
 Andrade SP, Machado RD, Teixeira AS, Belo AV, Tarso AM, Beraldo WT. 1997. Sponge-induced angiogenesis in mice and the pharmacological reactivity of the neovasculature quantitated by a fluorimetric method. *Microvasc Res* 54:253-261.

- Arthur WT, Vernon RB, Sage EH, Reed MJ. 1998. Growth factors reverse the impaired sprouting of microvessels from aged mice. *Microvasc Res* 55:260-270.
- Ausprunk DH, Knighton DR, Folkman J. 1974. Differentiation of vascular endothelium in the chick chorioallantois: a structural and autoradiographic study. *Dev Biol* 38:237-248.
- 5 Clark ER, Clark EL. 1939. Microscopic observations on the growth of blood capillaries in the living mammal. *Am J Anat* 64:251-301.
- Davis GE, Camarillo CW. 1996. An alpha 2 beta 1 integrin-dependent pinocytotic mechanism involving intracellular vacuole formation and coalescence regulates capillary lumen and tube formation in three-dimensional collagen matrix. *Exp Cell Res* 224:39-51.
- 10 Elsdale T, Bard J. 1972. Collagen substrata for studies on cell behaviour. *J Cell Biol* 54:626-637.
- Feder J, Marase JC, Olander JV. 1983. The formation of capillary-like tubes by calf aortic endothelial cells grown in vitro. *J Cell Physiol* 116:1-6.
- Fishman JA, Ryan GB, Karnovsky MJ. 1975. Endothelial regeneration in the rat carotid artery and the significance of endothelial denudation in the pathogenesis of myointimal thickening. *Lab Invest* 32:339-351.
- 15 Folkman J, Haudenschild C. 1980. Angiogenesis in vitro. *Nature* 288:551-556.
- Folkman J, Haudenschild CC, Zetter BR. 1979. Long-term culture of capillary endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:5217-5221.
- Gimbrone MA, Jr. 1976. Culture of vascular endothelium. En: *Prog Hemost Thromb*. p1-28.
- 20 Gimbrone MA, Jr., Cotran RS, Folkman J. 1974a. Human vascular endothelial cells in culture. Growth and DNA synthesis. *J Cell Biol* 60:673-684.
- Gimbrone MA, Jr., Cotran RS, Leapman SB, Folkman J. 1974b. Tumor growth and neovascularization: an experimental model using the rabbit cornea. *J Natl Cancer Inst* 52:413-427.
- Greenblatt M, Shubi P. 1968. Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique. *J Natl Cancer Inst* 41:111-124.
- 25 Hoying JB, Boswell CA, Williams SK. 1998. Angiogenic potential of microvessel fragments established in three-dimensional collagen gels. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 32:409-419.
- Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Mimcik CR. 1973. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 52:2745-2756.
- Jozaki K, Marucha PT, Despins AW, Kreutzer Do. 1990. An in vitro model of cell migration; evaluation of vascular endothelial cell migration. *Anal Biochem* 190:39-47.
- 30 Koike T, Vernon RB, Gooden MD, Sadotm E, Reed MJ. 2003. Inhibited angiogenesis in aging: a role for TIMP-2. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 58:B798-805.
- Kubota Y, Kleinman HK, Martin GR, Lawley TJ, 1988. Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *J Cell Biol* 107:1589-1598.
- 35 Kuzuya M, Kinsella JL. 1994. Induction of endothelial cell differentiation in vitro by fibroblast-derived soluble factors. *Exp Cell Res* 215:310-318.
- Maciag T, Kadish J, Wilkins L., Stemeran MB, Weinstein R, 1982. Organizational behavior of human umbilical vein endothelial cells. *J Cell Biol* 94:511-520.
- Madri JA. 1982. Endothelial cell-matrix interactions in hemostasis. *Prog Hemost Thromb* 6:1-24.
- 40 Madri JA, Pratt BM. 1986. Endothelial cell-matrix interactions: in vitro models of angiogenesis. *J Histochem Cytochem* 34:85-91.
- Madri JA, Pratt BM, Tucker AM. 1988. Phenotypic modulation of endothelial cells by transforming growth factor-beta depends upon the composition and organization of the extracellular matrix. *J Cell Biol* 105:1375-1384.
- Madri JA, Stenn KS. 1982. Aortic endothelial cell migration. I. Matrix requirements and composition. *Am J Pathol* 106:180-186.
- 45 Manoussaki D, Lubkin SR, Vernon RB, Murray JD. 1996. A mechanical model for the formation of vascular networks in vitro. *Acts Biotheor* 44:271-282.
- Marx M, Perlmutter RA, Madri JA. 1994. Modulation of platelet-derived growth factor receptor expression in microvascular endothelial cells during in vitro angiogenesis. *J Clin Invest* 93:131-139.
- 50 Merwiri JR, Anderson JM, Kocher O, Van Itallie CM, Madri JA. 1990. Transforming growth factor beta 1 modulates extracellular matrix organization and cell-cell junctional complex formation during in vitro angiogenesis. *J Cell Physiol* 142:117-128.
- Montesano R, Orci L. 1985. Tumor-promoting phorbol esters induce Angiogenesis in vitro. *Cell* 42:469-477.
- Montesano R, Orci L, Vassalli P. 1983. In vitro rapid organization of Endothelial cells into capillary-like networks is promoted by collagen matrices. *J Cell Biol* 97:1648-1652.
- 55 Montesano R, Pepper MS, Orci L. 1993. Paracrine induction of angiogenesis in vitro by Swiss 3T3 fibroblasts, *J Cell Sci* 105 Pt 4:1013-1024.
- Mori M, Sadahira Y, Kawasaki S, Hayashi T, Notohara K, Awai M. 1988. Capillary growth from reversed rat aortic segments cultured in collagen gel. *Acta Pathol Jpn* 38: 1503-1512.
- 60 Nehls V, Drenckhahn D. 1995. A novel, microcarrier-based in vitro assay for rapid and reliable quantification of three-dimensional cell migration and angiogenesis. *Microvasc Res* 50:311-322.
- Nehls V, Herrmann R. 1996. The configuration of fibrin clots determines capillary morphogenesis and endothelial cell migration. *Microvasc Res* 51:347-364.
- Neumann T, Nicholson BS, Sanders JE, 2003. Tissue engineering of perfused microvessels. *Microvasc Res* 66:59-67.
- 65 Nicosia RF, Bonanno E, Smith M, Yurchenco P. 1994a, Modulation of angiogenesis in vitro by laminin-entactin

- complex. *Dev Biol* 164:197-206.
- Nicosia RF, Bonanno E, Villaschi S. 1992. Large-vessel endothelium switches to a microvascular phenotype during angiogenesis in collagen gel culture of rat aorta. *Atherosclerosis* 95:191-199.
- 5 Nicosia RF, Nicosia SV, Smith M. 1994b, Vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and insulin-like growth factor-1 promote rat aortic angiogenesis in vitro. *Am J Pathol* 145:1023-1029.
- Nicosia RF, Ottinetti A. 1990. Modulation of microvascular growth and morphogenesis by reconstituted basement membrane gel in three-dimensional cultures of rat aorta: a comparative study of angiogenesis in matrigel, collagen, fibrin, and plasma clot. *In Vitro Cell Dev Biol* 26:119-128.
- 10 Nicosia RF, T'chao R, Leighton J. 1982. Histotypic angiogenesis in vitro: light microscopic, ultrastructural, and radioautographic studies. *In Vitro* 18:538-549.
- Nicosia RF, T'chao R, Leighton J. 1983. Angiogenesis-dependent tumor spread in reinforced fibrin clot cultures. *Cancer Res* 43:2159-2168.
- Nicosia RF, Tuszynski GP. 1994. Matrix-bound thrombospondin promotes angiogenesis in vitro, *J Cell Biol* 124:183-193.
- 15 Passaniti A, Taylor RM, Pili R, Guo Y, Long PV, Haney JA, Pauly RR, Grant DS, Martin GR. 1992. A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor. *Lab Invest* 87:519-528.
- Pepper MS, Montesano R, Vassalli JD, Orci L. 1991. Chondrocytes inhibit endothelial sprout formation in vitro: evidence for involvement of a transforming growth factor-beta. *J Cell Physiol* 146:170-179.
- 20 Rosen EM, Meromsky L, Setter E, Vinter DW, Goldberg ID. 1990. Quantitation of cytokine-stimulated migration of endothelium and epithelium by a new assay using microcarrier beads. *Exp Cell Res* 186:22-31.
- Sage EH, Vernon RB. 1994. Regulation of angiogenesis by extracellular matrix: the growth and the glue. *J Hypertens Suppl* 12:S145-152.
- Vernon, RB, Angello JC, Iruela-Arispe ML, Lane TF, Sage EH. 1992. Reorganization of basement membrane matrices by cellular traction promotes the formation of cellular networks in vitro. *Lab Invest* 66:536-547.
- 25 Vernon RB, Gooden MD. 2002. New technologies in vitro for analysis of cell movement on or within collagen gels. *Matrix Biol* 21:661-669.
- Vernon RB, Lara SL, Drake CJ, Iruela-Arispe ML, Angello JC, Little CD, Wight TN, Sage EH. 1995. Organized type I collagen influences endothelial patterns during "spontaneous angiogenesis in vitro"; planar cultures as models of vascular development. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 31:120-131.
- 30 Vernon, RB, Sage EH. 1999. A novel, quantitative model for study of endothelial cell migration and sprout formation within three-dimensional collagen matrices. *Microvasc Res* 57:118-133.
- Villaschi S, Nicosia, RF. 1993. Angiogenic role of endogenous basic fibroblast growth factor released by rat aorta after injury. *Am J Pathol* 143:181-190.
- 35

REIVINDICACIONES

1. Un método para la creación de redes de microvasos perfundibles *in vitro*, comprendiendo dicho método:

- 5 tirar de una pluralidad de mandriles a través de una matriz para formar más de un canal a través de la matriz;
inyectar células endoteliales en cada canal;
incubar la matriz para permitir que las células se fijen dentro de cada canal;
perfundir cada canal para eliminar las células no fijadas y para crear un vaso parental dentro de cada canal,
10 donde cada vaso parental incluye un canal hueco perfundible revestido de células en la matriz;
en donde mediante la exposición de cada vaso parental a un compuesto seleccionado de entre factor de
crecimiento de fibroblastos básico, factor de crecimiento endotelial vascular y 12-miristato-13-acetato de forbol,
se induce la formación de brotes en cada vaso parental en la matriz circundante que se anastomosan para
formar una red de microvasos, donde un vaso parental está conectado a través de una red de brotes a por lo
15 menos un segundo vaso parental.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la red de microvasos se somete a perfusión luminal a
través de cada vaso parental, en donde un perfusado líquido es desviado a través de los capilares reduciendo la
corriente en un vaso parental y aumentando la resistencia en un segundo vaso parental que está conectado al
primero por uno o más brotes, de manera que el perfusado es impulsado desde el vaso que tiene una presión más
20 alta al vaso con la presión más baja.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la perfusión del canal emplea al menos un perfusado
seleccionado del grupo que consiste en: medio de crecimiento celular oxigenado libre de suero y sustancias
angiogénicas o angiostáticas; y medio de crecimiento celular oxigenado suplementado con suero y/o compuestos
25 que influyen en la angiogénesis; y solución salina fisiológica oxigenada; un perfusado que comprende sangre
oxigenada; un perfusado que comprende componentes de la sangre; un perfusado que comprende sustitutos de la
sangre; un perfusado desoxigenado donde la oxigenación del sistema se consigue mediante la difusión a través de
la matriz; un perfusado que comprende al menos uno de compuestos angiogénicos y angiostáticos.
- 30 4. El método de la reivindicación 1, en el que los al menos dos vasos parentales comprenden matrices
multidimensionales de vasos perfundibles.
5. El método de la reivindicación 1, en el que la matriz comprende al menos uno de compuestos angiogénicos y
angiostáticos.
- 35 6. El método de la reivindicación 1, en el que las células comprenden células modificadas genéticamente que liberan
productos en un perfusado o en la matriz.
7. El método de la reivindicación 1, en el que la matriz comprende un material seleccionado del grupo que consiste
40 en fibrina, colágeno, gelatina, membrana basal gelificada, agar, agarosa, alginato, proteínas de la membrana basal,
gel de sílice, células y combinaciones de los mismos.
8. El método de la reivindicación 1, en el que las células se depositan en el canal de matriz mediante al menos un
método seleccionado de fijación previa al mandril, por inyección en el canal de la matriz después de la retirada del
mandril y por una combinación de fijación previa al mandril y también por inyección en la matriz.
- 45 9. El método de la reivindicación 1, en el que el mandril se retira de la matriz mediante al menos un método
seleccionado de extracción y descomposición.
- 50 10. El método de la reivindicación 1, en el que la matriz se llena con células seleccionadas de entre el grupo que
consiste en células endoteliales, células de músculo liso, pericitos, células humanas, células animales, células
vegetales, células madre, células musculares, células hepáticas, células renales, células de pulmón, células de la
piel, células epiteliales y células modificadas genéticamente.
- 55 11. El método de la reivindicación 1, en el que un fragmento de tejido sano o de tejido enfermo se incrusta en la
matriz, o en el que un fragmento de tejido canceroso se incrusta en la matriz.
- 60 12. El método de la reivindicación 1, en el que las redes de microvasos están constituidas por células normales o
modificadas genéticamente.

FIG. 1A

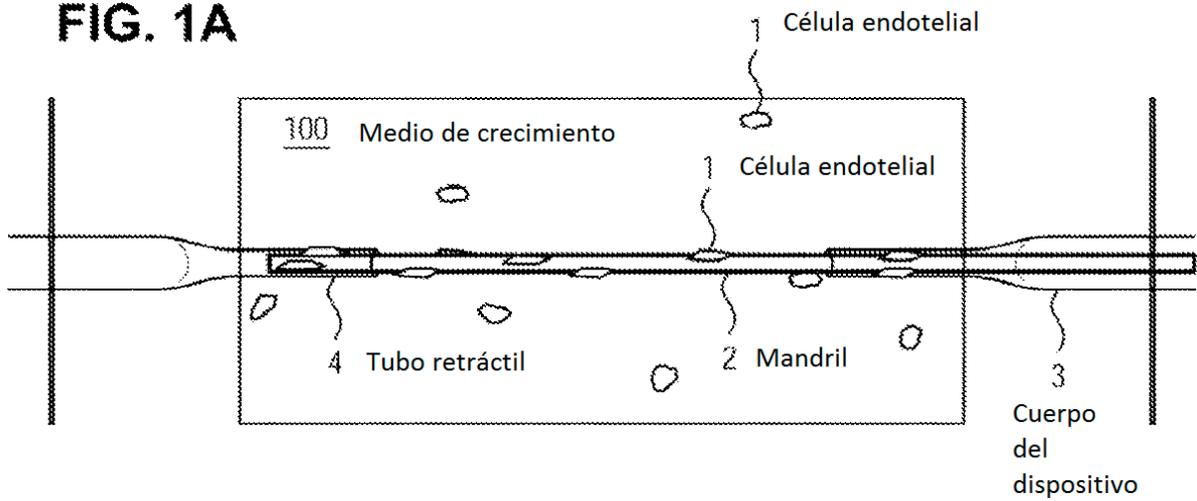


FIG. 1B

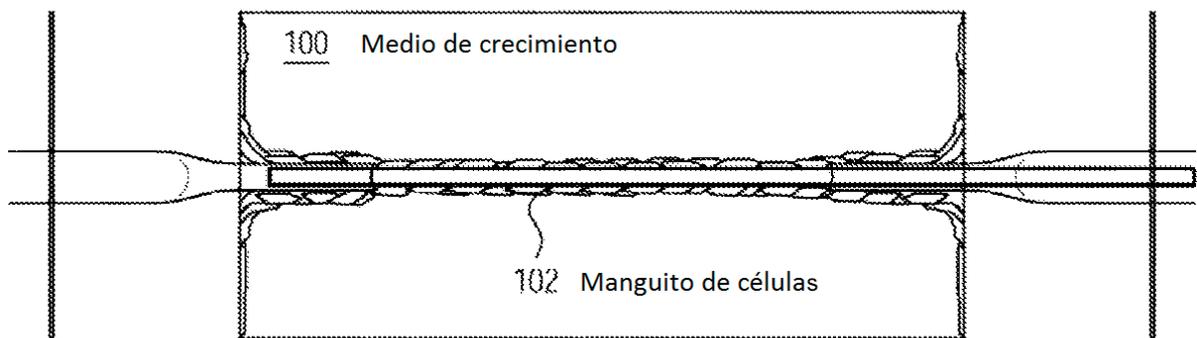


FIG. 1C

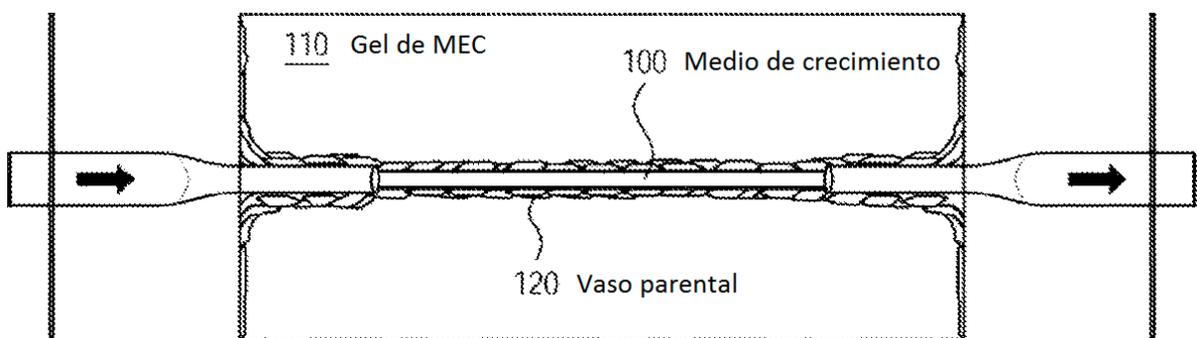


FIG. 2A
(Técnica anterior)

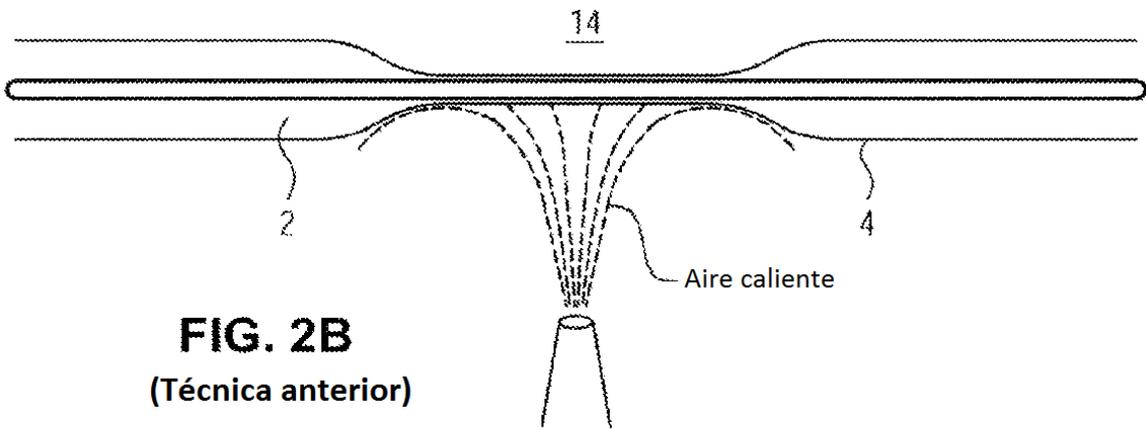
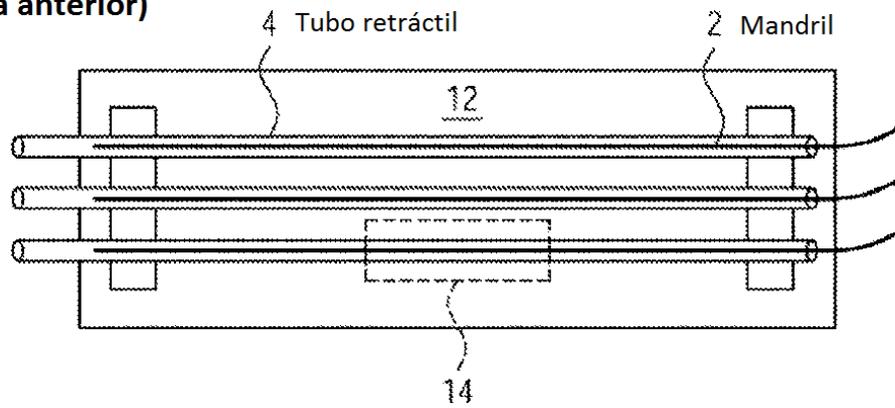


FIG. 2B
(Técnica anterior)

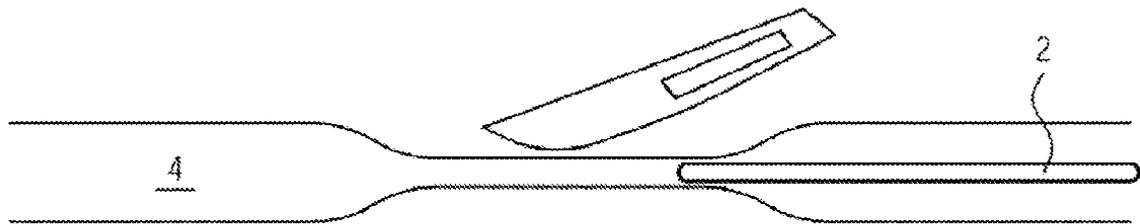


FIG. 2C
(Técnica anterior)

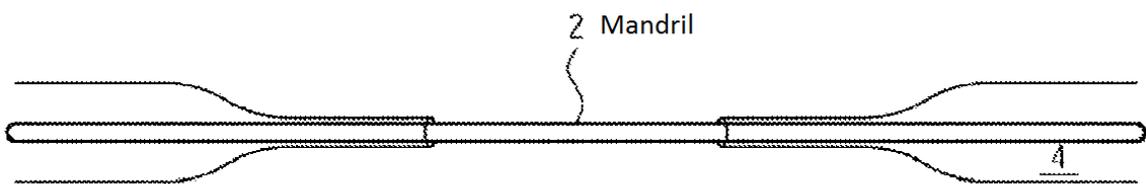


FIG. 2D
(Técnica anterior)

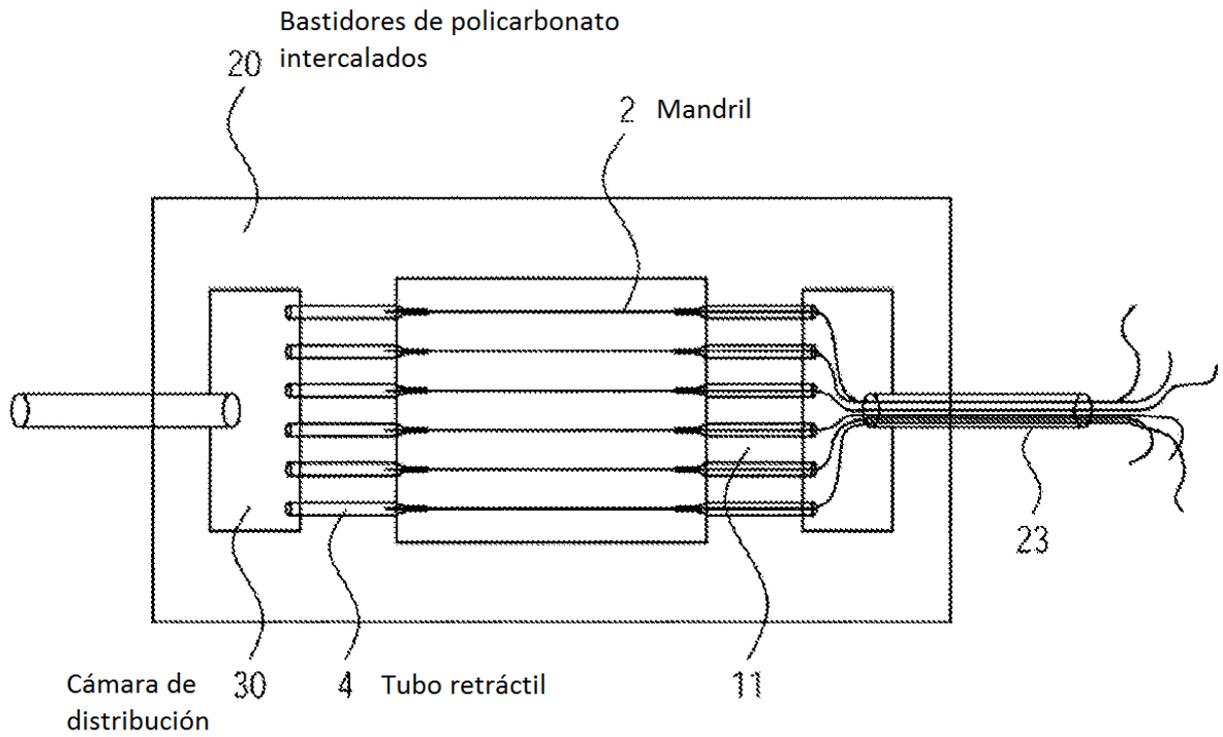


FIG. 3A
(Técnica anterior)

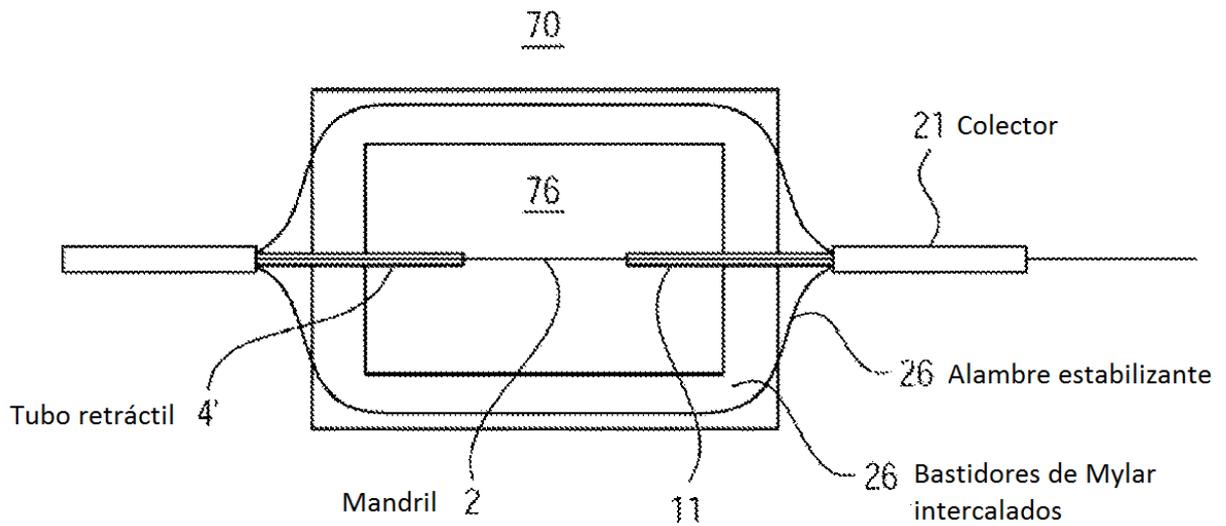


FIG. 3B

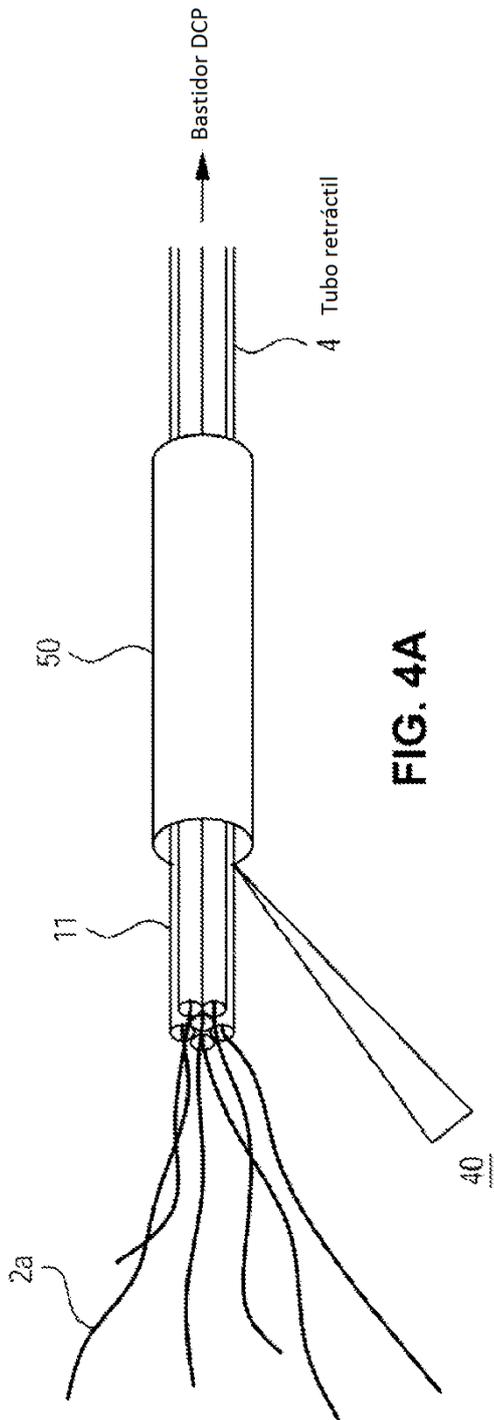


FIG. 4A

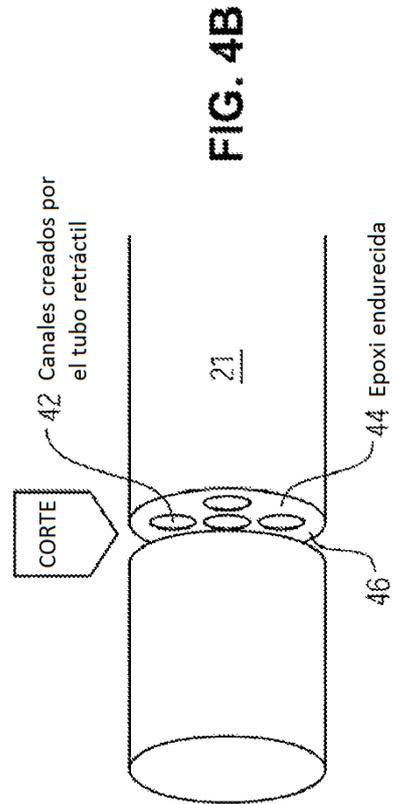


FIG. 4B

FIG. 5A

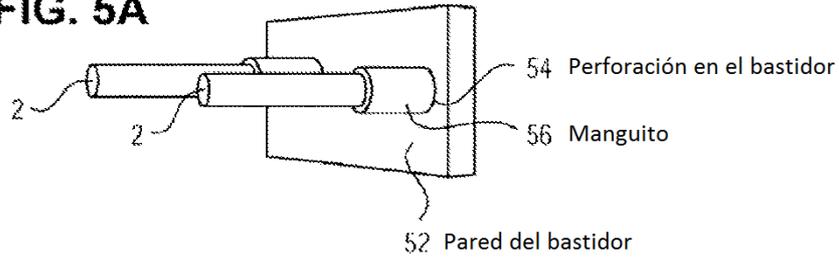


FIG. 5B

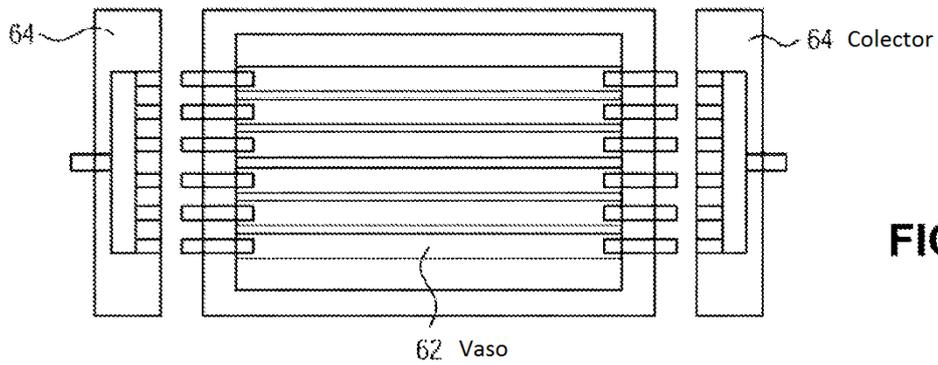
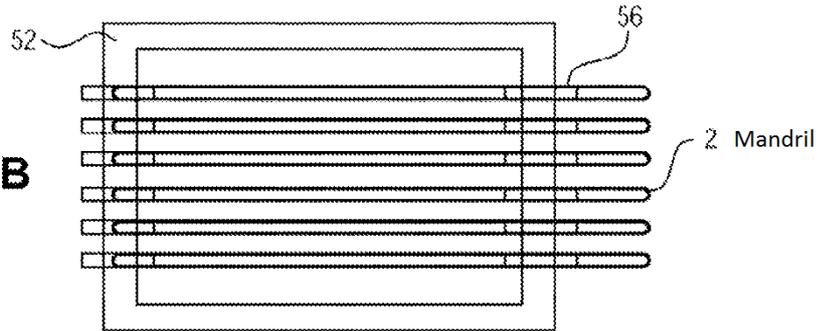


FIG. 5C

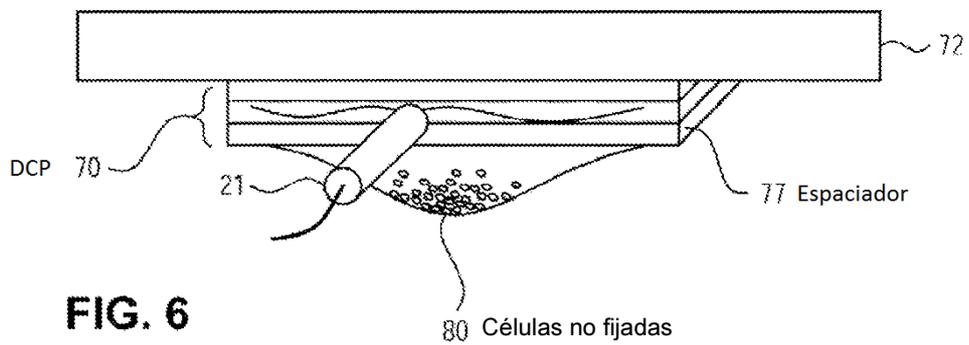
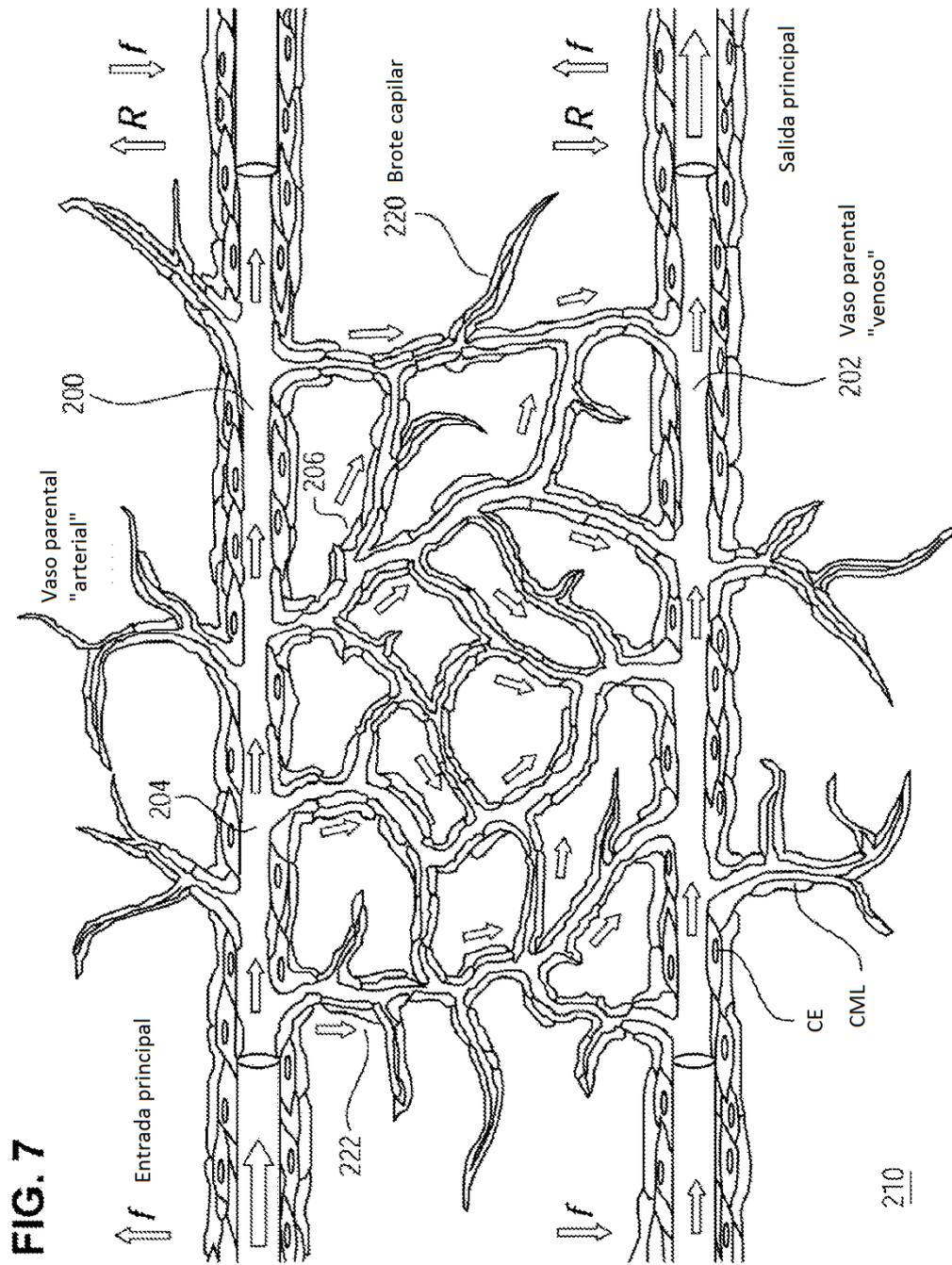


FIG. 6



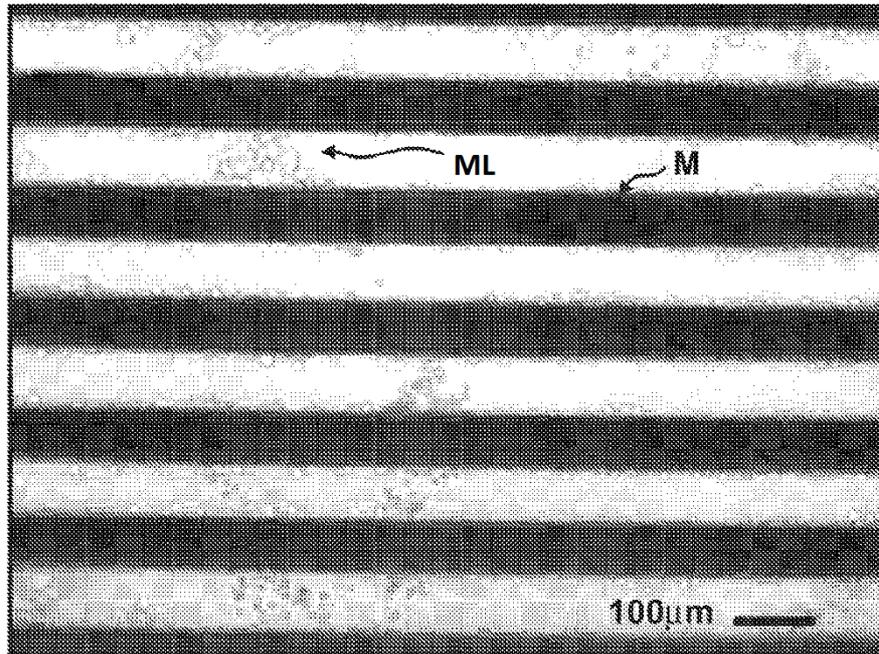


FIG. 8a

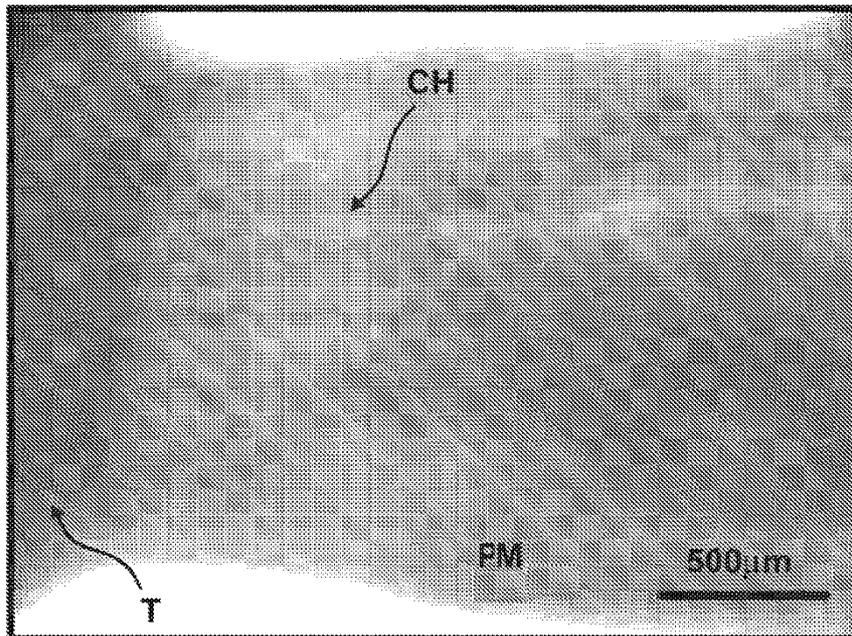


FIG. 8b

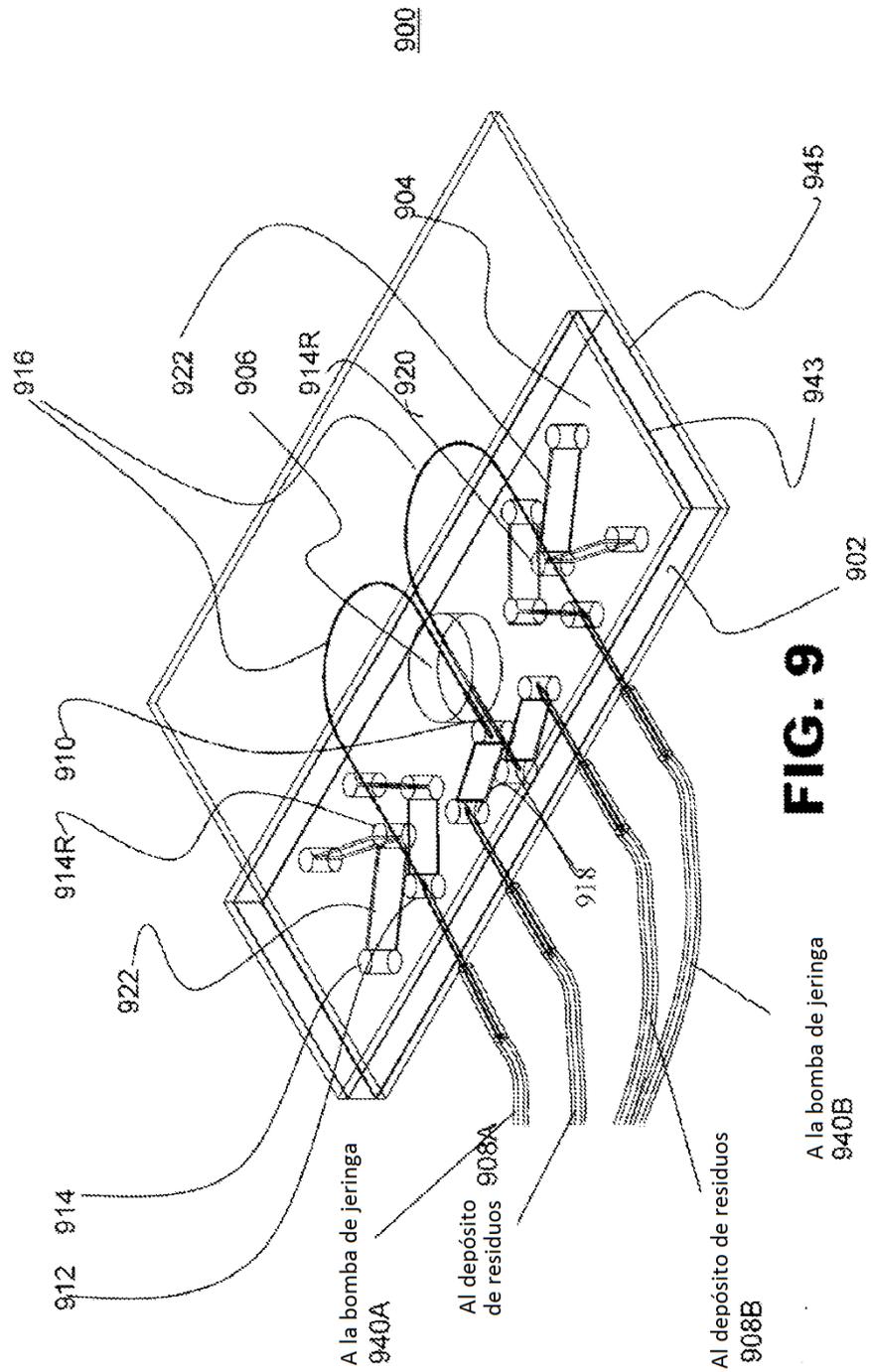


FIG. 10

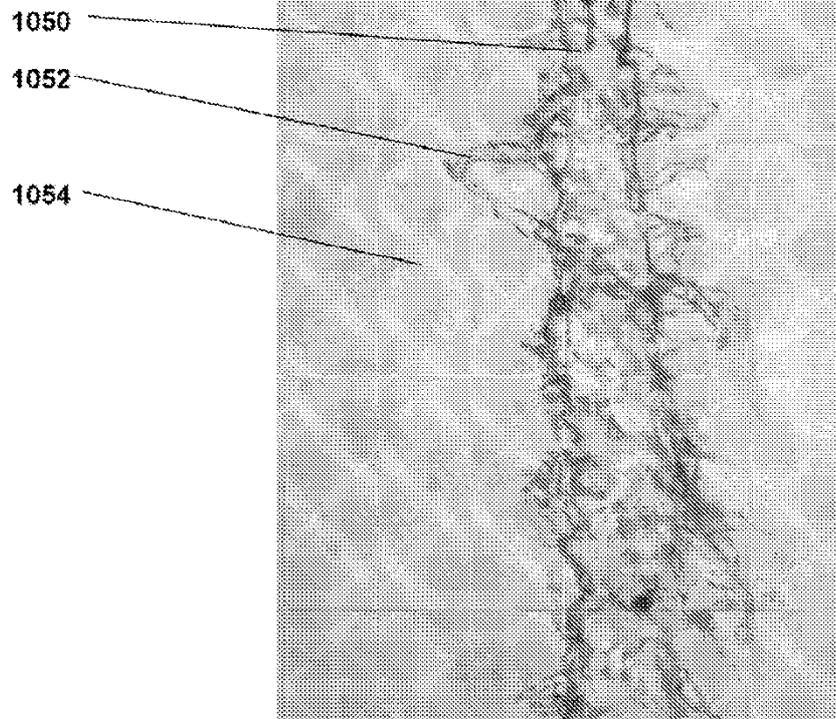


FIG. 11

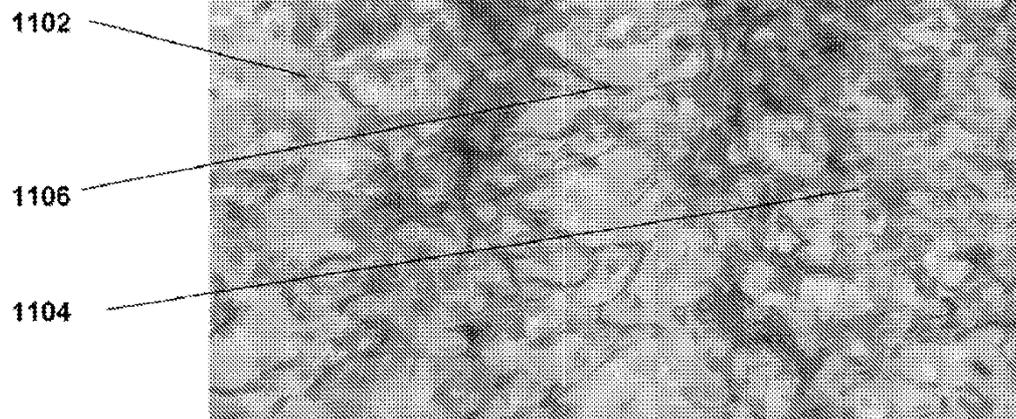


FIG. 12

