

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 620 778**

51 Int. Cl.:

A61K 35/42 (2006.01)

C12N 5/071 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.02.2010 PCT/US2010/023213**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.08.2010 WO2010091188**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.02.2010 E 10739128 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.01.2017 EP 2393914**

54 Título: **Ingeniería de tejidos de pulmón**

30 Prioridad:

04.02.2009 US 206799 P

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

29.06.2017

73 Titular/es:

**YALE UNIVERSITY (100.0%)
Two Whitney Avenue
New Haven, CT 06511, US**

72 Inventor/es:

**CALLE, ELIZABETH;
NIKLASON, LAURA, E.;
PETERSEN, THOMAS y
GUI, LIQIONG**

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 620 778 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

Ingeniería de tejidos de pulmón

La invención se refiere a un tejido de pulmón descelularizado que puede soportar el crecimiento celular, a composiciones que comprenden el mismo, así como a un método de preparación de un tejido de pulmón tridimensional creado por ingeniería que puede soportar y mantener el estado de diferenciación de una célula de pulmón.

Antecedentes de la invención

Cada año, 400.000 estadounidenses mueren de enfermedad del pulmón. Más preocupante, la tasa de muerte debida a enfermedad del pulmón está creciendo, mientras que las tasas de muerte de las otras categorías de enfermedades principales están disminuyendo (cardiopatía, cáncer y accidente cerebrovascular). Para varias enfermedades del pulmón, incluyendo fibrosis quística, enfisema/EPOC y fibrosis pulmonar idiopática, el trasplante de pulmón sigue siendo el único tratamiento definitivo. Sin embargo, la supervivencia de los pacientes tras el trasplante de pulmón es de sólo el 50% a los 5 años y del 24% a los 10 años [Mondrinos *et al.*, 2008, *Tissue Eng* 14:361-8]. Existe por tanto una gran demanda del desarrollo de tejido de pulmón creado por ingeniería que pueda usarse para trasplante. Una ventaja del tejido de pulmón creado por ingeniería es que el tejido puede hacerse crecer usando propias células del paciente, evitando de ese modo la necesidad de una fuerte inmunosupresión, tal como se requiere con el trasplante de pulmón actual. La inmunosupresión es necesaria para evitar el rechazo del órgano trasplantado, pero puede conducir a una amplia gama de problemas, incluyendo infección, tumor maligno, alteración del riñón, problemas cardiovasculares y trastornos neurológicos [Pietra *et al.*, 2000, *J Clin Invest* 106:1003-10; Christie *et al.*, 2009, *J Heart Lung Transplant* 28:1031-49].

La ingeniería de tejidos es un campo en crecimiento que busca combinar avances celulares, moleculares, tecnológicos y médicos para crear tejidos de sustitución adecuados para su implantación. Se ha hecho un trabajo prometedor en una variedad de tejidos, incluyendo vasos sanguíneos, vejiga urinaria, válvulas cardíacas y tejido cardíaco [Nichols *et al.*, 2008, *Proc Am Thor Soc* 5:723-30; Satchell *et al.*, 2004, *J Am Soc Nephrol* 15:566-74; Atala *et al.*, 2006, *Lancet* 367:1241-6; Orfanos *et al.*, 2004, *Intensive Care Med* 30: 1702-14]. Sin embargo, el pulmón es un tejido difícil de crear por ingeniería en el laboratorio. El pulmón requiere una matriz compleja que pueda aguantar las presiones mecánicas de la respiración, que pueda soportar el crecimiento de células endoteliales, epiteliales y mesenquimatosas y que proporcione un medio para el intercambio gaseoso entre dos compartimentos diferentes aunque íntimamente yuxtapuestos.

Además de su posible uso en pacientes en entornos clínicos, el tejido de pulmón creado por ingeniería puede usarse en el laboratorio para estudiar una amplia variedad de importantes aspectos de la fisiología y biología pulmonares. Hay muy pocos modelos de cultivo de pulmón tridimensionales *in vitro* [Vandenbroucke *et al.*, 2008, *Ann N Y Acad Sci* 1123:134-45]. Además, las células epiteliales y endoteliales pulmonares son más difíciles de cultivar en el laboratorio que muchos otros tipos de células [Malda *et al.*, 2004, *Biomateriales* 25:5773-80; Reichenspurner, 2005, *J Heart Lung Transplant* 24:119-30], y ha habido un progreso relativamente lento en el campo de la biología de células madre y progenitoras pulmonares [Blaisdell *et al.*, 2009, *Stem Cells* 27:2263-70; Muratore *et al.*, 2008, *J Surg Res* 155(2):225-30]. Por tanto, existe la necesidad en la técnica del desarrollo de un tejido de pulmón *in vitro* que replique características claves del entorno pulmonar nativo. La presente invención satisface esta necesidad en la técnica.

Breve resumen de la invención

La invención proporciona un tejido de pulmón descelularizado que puede soportar el crecimiento celular. El tejido de pulmón descelularizado presenta una característica de un tejido natural correspondiente antes de la descelularización.

Específicamente, la invención proporciona un tejido de pulmón descelularizado que puede soportar el crecimiento celular, en el que el tejido de pulmón descelularizado presenta una característica de un tejido natural correspondiente antes de la descelularización, en el que el tejido de pulmón descelularizado presenta propiedades mecánicas sustancialmente similares a las de dicho tejido natural correspondiente y en el que el tejido de pulmón descelularizado se produce usando una disolución de descelularización que comprende una disolución hipertónica, un detergente y un agente quelante.

En una realización, el tejido de pulmón descelularizado presenta una morfología sustancialmente similar a la de un tejido por lo demás idéntico antes de la descelularización.

En otra realización, el tejido de pulmón descelularizado conserva una matriz extracelular de dicho tejido natural correspondiente, en el que dicha matriz extracelular comprende una superficie exterior, y en el que dicha superficie exterior está sustancialmente intacta.

En otra realización, se han eliminado sustancialmente los marcadores inmunogénicos del tejido de pulmón descelularizado.

5 La invención proporciona además una composición que comprende el tejido de pulmón descelularizado anterior, en la que dicho tejido de pulmón descelularizado es un almacén tridimensional. La invención proporciona además un método de preparación de un tejido de pulmón tridimensional creado por ingeniería que puede soportar y mantener el estado de diferenciación de una célula de pulmón, comprendiendo dicho método sembrar un almacén de pulmón descelularizado con una población de células de pulmón para producir un almacén de pulmón sembrado, en el que el almacén de pulmón descelularizado se produce usando una disolución de descelularización que comprende una disolución hipertónica, un detergente y un agente quelante.

La invención proporciona además una composición implantable que comprende el tejido de pulmón descelularizado anterior.

10 Realizaciones adicionales de la invención son tal como se indican en las reivindicaciones.

El tejido de pulmón descelularizado presenta propiedades mecánicas sustancialmente similares a las de un tejido natural correspondiente.

La invención proporciona una composición que comprende un almacén tridimensional y una población de células. Preferiblemente, la composición puede soportar y mantener el estado de diferenciación de una célula de pulmón.

15 En una realización, el almacén tridimensional es un tejido descelularizado.

En otra realización, la composición presenta una red vascular y un árbol respiratorio intactos.

En otra realización, la población de células comprende una célula madre.

En otra realización, la población de células comprende células epiteliales y endoteliales.

20 En otra realización, las células están modificadas genéticamente. En una realización, la célula está modificada genéticamente para expresar el gen de CFTR.

En una realización, la composición puede soportar y mantener el estado de diferenciación de una célula epitelial alveolar.

25 En otra realización, el almacén comprende un material biocompatible seleccionado del grupo que consiste en fibronectina, laminina, colágeno, glicoproteína, trombospondina, elastina, fibrilina, mucopolisacárido, glicolípido, sulfato de heparina, sulfato de condroitina, sulfato de queratina, glucosaminoglucano, ácido hialurónico, proteoglicano, vitronectina, poli-D-lisina, polisacárido, y combinaciones de los mismos.

En una realización, las células presentan expresión génica asociada con inducción de morfogénesis de ramificación.

30 En otra realización, la composición comprende una característica de un tejido de pulmón. En algunos casos, la característica se selecciona del grupo que consiste en morfogénesis de ramificación, citodiferenciación epitelial del pulmón distal, crecimiento epitelial, desarrollo vascular, y combinaciones de los mismos.

35 La solicitud da a conocer un método *in vitro* para examinar un agente de prueba para determinar la capacidad del agente de prueba para modular la salud de un tejido de pulmón. El método comprende poner en contacto un agente de prueba con un modelo de tejido de pulmón tridimensional creado por ingeniería y medir el efecto que el agente de prueba tiene sobre el modelo. Cualquier alteración en el modelo es una indicación de que el agente de prueba puede modular la salud de un tejido de pulmón.

El agente de prueba se selecciona del grupo que consiste en un agente químico, un producto farmacéutico, un péptido, un ácido nucleico y radiación.

El agente de prueba es un vehículo de administración para un agente terapéutico.

40 El método comprende determinar el efecto del agente de prueba sobre el número, el área, el volumen, la forma, la morfología, la expresión de marcadores o la fragmentación cromosómica de la célula.

Además, el método comprende la etapa de seleccionar un agente que tiene un efecto deseado sobre el modelo de tejido de pulmón.

45 Se da a conocer además un método de alivio o tratamiento de un defecto del pulmón en un mamífero. El método comprende administrar a un mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un constructo tridimensional que puede soportar y mantener el estado de diferenciación de una célula de pulmón, aliviando o tratando de ese modo el defecto del pulmón en el mamífero.

Breve descripción de los dibujos

Para el fin de ilustrar la invención, se representan en los dibujos determinadas realizaciones de la invención. Sin embargo, la invención no se limita a las disposiciones e instrumentalidades precisas de las realizaciones

representadas en los dibujos.

5 La figura 1, que comprende las figuras 1A a 1D, es una serie de imágenes que representan un ensayo de ADN cuantitativo y de tinción de H&E de pulmón nativo y descelularizado. La figura 1 demuestra que el material celular se eliminó aunque la arquitectura del armazón se mantuvo. Se eliminó el ADN hasta ~1,2% de los niveles nativos. * indica $p < 0,01$. La figura 1D es una imagen de pulmón descelularizado.

La figura 2, que comprende las figuras 2A y 2B, es una serie de imágenes que representan la tinción del ADN restante en armazones descelularizados. El ADN se tiñe usando DAPI. Se expusieron las imágenes durante el mismo tiempo para permitir la comparación.

10 La figura 3 es una inmunotransferencia de tipo Western para antígeno de CMH de clase I y II, que demuestra la falta de antígeno de CMH de clase I o II en armazones descelularizados.

15 La figura 4, que comprende las figuras 4A y 4B, es una serie de imágenes que representan la tinción de colágeno en pulmón nativo y descelularizado. El colágeno I se tiñe de verde, el colágeno IV se tiñe de rojo, y los núcleos se tiñen como contraste de azul con DAPI. El colágeno I se encuentra cerca de vasos grandes mientras que el colágeno IV se distribuye por todo el parénquima. Obsérvese que en pulmón nativo, los glóbulos rojos en el parénquima aparecen verdes debido a autofluorescencia.

La figura 5, que comprende las figuras 5A y 5B, es una serie de imágenes que representan EM de barrido de pulmón nativo y descelularizado. Los tabiques alveolares están intactos. Las barras de escala son de 100 μm en los paneles izquierdos y de 20 μm en los paneles derechos.

20 La figura 6, que comprende las figuras 6A a 6C, es una serie de imágenes que representan EM de transmisión de pulmón nativo y descelularizado. La membrana basal alveolar se conserva cuando la presión de perfusión de descelularización se mantiene por debajo de 30 mmHg. C indica capilares, A indica alveolos y S indica los tabiques alveolares. Las barras de escala son de 2 μm en todos los paneles.

25 La figura 7 es una imagen que representa EM de transmisión de pulmón descelularizado que demuestra capilares conservados. La presión de perfusión para la descelularización era menor de 20 mmHg. C indica capilares, mientras que A indica alveolos. Las dimensiones de los alveolos y capilares parecen más pequeñas de lo que se produce *in vivo*, debido a la compresión de la matriz descelularizada. Las barras de escala son de 2 μm en los paneles superiores, 1 μm en el panel izquierdo inferior y 500 nm en el panel derecho inferior.

30 La figura 8 es un gráfico que representa retención de microesferas de 5 μm por armazones descelularizados. El ensayo de microesferas demuestra que una baja presión de perfusión (< 30 mmHg) durante la descelularización permite la retención del 95% de partículas de 5 μm en el compartimento de las vías respiratorias. * indica $p < 0,05$ en comparación con nativo.

La figura 9, que comprende las figuras 9A y 9B, es una serie de imágenes de una micro CT de la vasculatura de pulmón nativo y descelularizado. Globalmente, los armazones descelularizados parecen similares a los nativos, cuando se toman imágenes con una resolución de 58 μm .

35 La figura 10, que comprende las figuras 10A y 10B, es una serie de imágenes que representan micro CT de alta resolución de la vasculatura de pulmón nativo y descelularizado. La resolución de estos barridos es de 6,5 μm .

La figura 11 es un esquema que representa un protocolo de pruebas mecánicas. En resumen, se une una tira de tejido de pulmón a la placa superior, que entonces se hace descender y el tejido se une a la placa inferior. El tejido se estira cíclicamente hasta un 20% de deformación y luego se estira hasta el fallo.

40 La figura 12, que comprende las figuras 12A a 12C, es una serie de imágenes que representan el contenido en y la tinción de colágeno de pulmón nativo y descelularizado. La tinción tricrómica de Masson revela fibras de color azul oscuro onduladas en pulmón tanto nativo como descelularizado. El ensayo cuantitativo demuestra la conservación del colágeno en pulmones nativos y descelularizados, pero la pérdida del colágeno tras la descelularización usando dodecilsulfato de sodio (SDS). * indica $p < 0,01$.

45 La figura 13, que comprende las figuras 13A a 13C, es una serie de imágenes que representan histoquímica de elastina (Verhoff-van Geison) para pulmón nativo y descelularizado. La figura 13 representa fibras de elastina oscuras onduladas en pulmón tanto nativo como descelularizado. El ensayo cuantitativo demuestra la conservación de algo de elastina en pulmones descelularizados en comparación con nativos. * indica $p < 0,01$.

50 La figura 14, que comprende las figuras 14A a 14C, es una serie de imágenes que representan histoquímica de GAG (azul alcian) para pulmón nativo y descelularizado. Se representa la tinción de GAG azul en pulmón nativo pero su ausencia en pulmón descelularizado. El ensayo cuantitativo demuestra la pérdida de GAG sulfatados en pulmones descelularizados en comparación con pulmón nativo. * indica $p < 0,01$.

La figura 15 es una imagen que representa curvas de tensión-deformación de pulmón nativo y descelularizado. SDS

indica un pulmón tratado con dodecilsulfato de sodio.

La figura 16 es un gráfico que representa las fuerzas de tracción últimas de pulmón nativo, descelularizado y descelularizado con SDS. SDS indica un pulmón descelularizado usando dodecilsulfato de sodio. * indica $p < 0,01$ en comparación con nativo.

- 5 La figura 17, que comprende las figuras 17 A y 17B, es una serie de imágenes que representan diagramas esquemáticos del biorreactor usado para el cultivo de pulmón *in vitro*.

La figura 18, que comprende las figuras 18A y 18B, es una serie de imágenes que representan las presiones traqueal y de la arteria pulmonar durante cultivo de pulmón *in vitro*. La velocidad de perfusión es de ~5 ml/min.

- 10 La figura 19, que comprende las figuras 19A a 19C, es una serie de imágenes que representan el efecto de la ventilación con aire frente a líquido sobre la arquitectura del pulmón y el epitelio de las vías respiratorias. La ventilación con aire provoca dilatación de las vías respiratorias y destrucción del epitelio de las vías respiratorias tras un cultivo de 3 días.

- 15 La figura 20, que comprende las figuras 20A y 20B, es una serie de imágenes que representan el efecto de la presión y perfusión vascular sobre la apoptosis celular y el número de células durante el cultivo de pulmón nativo. * indica $p < 0,01$ y # indica $p < 0,05$ en comparación con nativo.

La figura 21, que comprende las figuras 21A a 21D, es una serie de imágenes que representan una comparación de la expresión de CCSP y SPC en pulmón nativo y pulmón cultivado perfundido. CCSP y SPC se tiñen en rojo, tiñéndose como contraste los núcleos en azul con DAPI.

- 20 La figura 22, que comprende las figuras 22A y 22B, es una serie de imágenes que representan una comparación de la expresión de PECAM en pulmón nativo y pulmón cultivado perfundido. Se observa todavía expresión de PECAM para cultivo de pulmón perfundido (30 mmHg). PECAM se tiñe de rojo, tiñéndose como contraste los núcleos en azul con DAPI.

- 25 La figura 23, que comprende las figuras 23A y 23B, es una serie de imágenes que representan el efecto de la ventilación sobre la apoptosis celular y el número de células durante el cultivo de pulmón nativo. * indica $p < 0,01$ y # indica $p < 0,05$ en comparación con nativo.

- 30 La figura 24, que comprende las figuras 24A a 24C, es una serie de imágenes que representan núcleos apoptóticos en pulmón cultivado nativo y ventilado. La ventilación con una única conexión condujo a una tasa mucho más alta de núcleos apoptóticos, en comparación con pulmón nativo o ventilación con un "bucle" de las vías respiratorias. Los núcleos apoptóticos se tiñen de marrón por medio de TUNEL, tiñéndose como contraste los núcleos normales de verde.

La figura 25, que comprende las figuras 25A a 25J, es una serie de imágenes que representan la estructura alveolar en pulmón nativo y cultivado 7 días. La morfología celular, estructura alveolar y arquitectura de los tabiques parecen similares entre pulmón nativo y cultivado, ventilado. Las figuras 25C a 25J representan el mantenimiento de la diferenciación de células pulmonares tras 7 días de cultivo de pulmón ventilado *in vitro*.

- 35 La figura 26 es una imagen que demuestra que la ventilación permite la perfusión pasiva de la vasculatura pulmonar. Se encuentran microsferas en vasos y capilares debido únicamente a movimientos ventilatorios del pulmón durante el cultivo *in vitro*.

La figura 27, que comprende las figuras 27A y 27B, es una serie de imágenes que representan la tinción de H&E de la línea celular epitelial inmortalizada MLE-12 cultivada sobre armazones descelularizados.

- 40 La figura 28, que comprende las figuras 28A a 28F, es una serie de imágenes que representan la tinción de citometría de flujo de un panel de marcadores pulmonares de células pulmonares neonatales aisladas. Las curvas azul o verde son cepas control de isotipo y la roja es el antígeno indicado.

La figura 29 es una imagen que representa la tinción de H&E de pulmón creado por ingeniería a los 8 días de cultivo. Las condiciones en este caso están optimizadas para crecimiento celular epitelial.

- 45 La figura 30, que comprende las figuras 30A y 30B, es una serie de imágenes que representan la tinción de PCNA de pulmón creado por ingeniería a los 4 y 8 días de cultivo. Los núcleos en proliferación se tiñen de marrón para PCNA; los núcleos negativos se tiñen como contraste con hematoxilina.

- 50 La figura 31, que comprende las figuras 31A y 31B, es una serie de imágenes que representan la tinción TUNEL de pulmón creado por ingeniería a los 4 y 8 días de cultivo. Los núcleos positivos son marrones, mientras que los núcleos negativos se tiñen como contraste con verde de metilo.

La figura 32, que comprende las figuras 32A a 32B, es una serie de imágenes que representan la tinción de proteína secretora de células Clara (CCSP) pulmón nativo y creado por ingeniería a los 4 días. CCSP se tiñe de rojo,

mientras que los núcleos se tiñen como contraste de azul con DAPI.

La figura 33, que comprende las figuras 33A a 33C, es una serie de imágenes que representan la tinción de proteína C tensioactiva de pulmón nativo y creado por ingeniería a los 4 días y 8 días. SPC se tiñe de rojo, mientras que los núcleos se tiñen como contraste de azul con DAPI.

- 5 La figura 34, que comprende las figuras 34A a 34C, es una serie de imágenes que representan la tinción de acuaporina-5 de pulmón nativo y creado por ingeniería a los 4 días. AQP se tiñe de rojo, mientras que los núcleos se tiñen como contraste de azul con DAPI.

10 La figura 35, que comprende las figuras 35A y 35B, es una serie de imágenes que representan la tinción doble para SPC y CCSP en tejido de pulmón creado por ingeniería. SPC se tiñe de verde, CCSP se tiñe de rojo, y los núcleos de tiñen como contraste de azul con DAPI. Las células positivas dobles para SPC-CCSP aparecen de color amarillo.

La figura 36, que comprende las figuras 36A a 36C, es una serie de imágenes que representan la tinción de citoqueratina-14 para células basales en pulmón nativo y creado por ingeniería. La citoqueratina se tiñe de rojo, mientras que los núcleos se tiñen como contraste de azul con DAPI.

15 La figura 37 es una imagen que representa la tinción doble para citoqueratina-14 y CCSP en pulmón creado por ingeniería. La citoqueratina-14 se tiñe de rojo, CCSP se tiñe de verde, y los núcleos de tiñen como contraste de azul con DAPI.

La figura 38, que comprende las figuras 38A y 38B, es una serie de imágenes que representan la tinción de actina α de pulmón nativo y creado por ingeniería. La actina α se tiñe de verde, mientras que los núcleos se tiñen como contraste de azul con DAPI.

20 La figura 39, que comprende las figuras 39A a 39F, es una serie de imágenes que representan el efecto de la composición del medio sobre el desarrollo epitelial. Las estructuras epiteliales se dirigen hacia la expresión apical de gránulos de SPC con pérdida de expresión de CCSP cuando se cultivan en medio BGJb. En medio DMEM, las células conservan la expresión de tanto SPC como CCSP, con expresión de SPC difusamente citoplasmática.

25 La figura 40 es una imagen que representa la expresión de tensioactivo en tejidos epiteliales creados por ingeniería. "Lad" es un marcador de tamaño molecular de proteínas; las bandas indicadas son de 20 y 25 kDa; "Nat" es tejido de pulmón nativo; "Vent" es tejido de pulmón creado por ingeniería ventilado con medio DMEM; "Perf" es tejido de pulmón creado por ingeniería perfundido con medio DMEM; "DMEM" es pulmón creado por ingeniería cultivado de manera estática en medio DMEM; "BGJb" es pulmón creado por ingeniería cultivado de manera estática en medio BGJb; "ALI" es pulmón creado por ingeniería ventilado con aire; y "Decell" es armazón descelularizado.

30 La figura 41, que comprende las figuras 41A a 41C, es una serie de imágenes que representan el efecto de la ventilación con aire sobre el desarrollo epitelial en tejido de pulmón creado por ingeniería. Se observa expresión de AQP en células parenquimatosas (parte superior izquierda) que también son positivas para SPC (figura 41B), así como una fuerte expresión ocasional en células epiteliales cúbicas (parte superior derecha). También se observa expresión de CCSP en epitelio cúbico (figura 41C).

35 La figura 42, que comprende las figuras 42A y 42B, es una serie de imágenes que representan epitelio ciliado en pulmón nativo y creado por ingeniería. Las células ciliadas se resaltan en rojo para pulmón creado por ingeniería.

La figura 43, que comprende las figuras 43A y 43B, es una serie de imágenes que representan el efecto de la perfusión y ventilación sobre cultivo de pulmón creado por ingeniería.

40 La figura 44, que comprende las figuras 44A a 44D, es una serie de imágenes que representan el efecto de la perfusión y ventilación sobre la proliferación y apoptosis celulares en cultivo de pulmón creado por ingeniería.

La figura 45, que comprende las figuras 45A y 45B, es una serie de imágenes que representan el efecto de la perfusión y ventilación sobre la expresión de CCSP en tejido de pulmón creado por ingeniería. CCSP se tiñe de rojo, mientras que los núcleos se tiñen como contraste de azul con DAPI.

45 La figura 46, que comprende las figuras 46A a 46B, es una serie de imágenes que representan el efecto de la perfusión y ventilación sobre la expresión de SPC en tejido de pulmón creado por ingeniería. SPC se tiñe en rojo, y los núcleos se tiñen como contraste de azul con DAPI.

La figura 47 es una imagen que representa una tinción de H&E de un armazón descelularizado recubierto con fibronectina sembrado con células endoteliales microvasculares de pulmón de rata.

50 La figura 48, que comprende las figuras 48A y 48B, es una serie de imágenes que representan la tinción de H&E de endotelio de pulmón creado por ingeniería perfundido frente a ventilado.

La figura 49, que comprende las figuras 49A y 49B, es una serie de imágenes que representan la tinción TUNEL de endotelio de pulmón creado por ingeniería perfundido frente a ventilado. EC cultivado con ventilación sólo son

sustancialmente más apoptóticos que pulmón perfundido. Los núcleos apoptóticos se tiñen de marrón por medio de TUNEL mientras que los núcleos negativos se tiñen como contraste con verde de metilo.

5 La figura 50 es una demostración en imagen de la formación de una unión fuerte entre células endoteliales en tejido de pulmón creado por ingeniería. Las células endoteliales se marcan con asteriscos, separadas por una unión célula-célula extendida. La barra de escala es de 500 nm.

La figura 51, que comprende las figuras 51 A y 51 B, es una serie de imágenes que representan la expresión de VE-cadherina en pulmón nativo y creado por ingeniería. VE-cadherina se tiñe de rojo, tiñéndose como contraste los núcleos en azul con DAPI.

10 La figura 52 es un gráfico que representa la permeabilidad de pulmones creados por ingeniería sembrados con células endoteliales junto con dextranos marcados con FITC de 2 megadalton. * indica $p < 0,05$ en comparación con armazones descelularizados.

La figura 53 es un gráfico que representa la resistencia a la rotura por tracción de tejidos creados por ingeniería. También se muestran las resistencias de pulmones nativos y descelularizados.

15 La figura 54, que comprende las figuras 54A a 54C, es una serie de imágenes que representan los impactos del medio sobre el crecimiento de tejido endotelial creado por ingeniería. Se cultivó endotelio perfundido creado por ingeniería en el tipo de medio indicado. Se muestra la histología de H&E en los paneles izquierdos, mientras que los paneles derechos muestran núcleos apoptóticos en marrón (por medio de TUNEL) mientras que los núcleos normales se tiñen como contraste con verde de metilo.

20 La figura 55 es una serie de imágenes que demuestran que tráquea descelularizada preparada con incubación en tampón CHAPS durante 4-8 horas mantenía la matriz de colágeno y presentaba eliminación de la mayor parte de las células del tejido.

La figura 56 es una serie de imágenes que demuestran que la tráquea descelularizada contenía los tres tipos de COL observados en la tráquea nativa.

25 La figura 57 es una serie de imágenes que demuestran que la tráquea descelularizada soportaba la adhesión y el crecimiento de NHBE.

La figura 58 es una serie de imágenes que demuestran que la tráquea descelularizada soportaba la adhesión y el crecimiento de SAEC.

La figura 59 es una serie de imágenes que demuestran que NHBE infectadas con GFP-lentivirus no mostraban un cambio de morfología obvio tras 6 horas.

30 La figura 60 es una serie de imágenes que demuestran que estaban presentes números significativos de microesferas en cada lóbulo del pulmón de ratón tras administración mediante instilación en las vías respiratorias.

La figura 61 es una serie de imágenes que demuestran la inyección satisfactoria de células en los pulmones, y que células epiteliales humanas que se habían transducido con un transgén (GFP) se adherían al epitelio pulmonar.

35 La figura 62 es una serie de imágenes que representan células con GFP usada para la inyección tal como se observa antes de la tripsinización.

La figura 63, que comprende las figuras 63A a 63C, es una serie de imágenes que demuestran que se encontraron células epiteliales de las vías respiratorias humanas positivas para GFP (tanto NHBE como SAEC) en pulmones de ratón durante días tras la instilación en las vías respiratorias.

40 La figura 64, que comprende las figuras 64A y 64B, es una serie de imágenes que demuestran el pulmón creado por ingeniería implantado en insuflación y desinflamiento durante el ciclo ventilatorio.

Descripción detallada de la invención

45 La presente invención proporciona tejido de pulmón descelularizado que puede soportar el crecimiento celular y un método para preparar un tejido de pulmón tridimensional creado por ingeniería que puede soportar y mantener el estado de diferenciación de una célula de pulmón. La presente invención proporciona además composiciones que comprenden el tejido de pulmón descelularizado. La presente invención se basa parcialmente en el descubrimiento de que puede generarse un tejido de pulmón tridimensional para que presente características de un tejido de pulmón natural.

50 El tejido de pulmón creado por ingeniería se deriva de un tejido de pulmón nativo descelularizado. Los tejidos descelularizados carecen sustancialmente de células y ADN. Preferiblemente, el tejido descelularizado también carece de moléculas inmunogénicas. Más preferiblemente, el tejido descelularizado conserva varias moléculas de la matriz extracelular claves que son importantes para la unión y proliferación celulares.

La invención incluye un método de descelularización de un tejido. El método de descelularización incluye eliminar material celular y nuclear del tejido al tiempo que se conservan aspectos clave de y se minimiza cualquier daño a la matriz extracelular del pulmón. En una realización, el procedimiento de descelularización también incluye eliminar moléculas antigénicas del tejido haciendo de ese modo que el tejido sea no inmunogénico. En una realización, el procedimiento de descelularización de la invención incluye generar un armazón descelularizado que es completamente compatible con el cultivo celular y al mismo tiempo proporciona una función de barrera. Preferiblemente, el armazón descelularizado es un armazón de pulmón que tiene una red vascular y un árbol respiratorio intactos.

La solicitud también da a conocer un biorreactor. Preferiblemente, el biorreactor puede soportar el cultivo *in vitro* de cualquier tejido tridimensional. El biorreactor puede ventilar los pulmones por medio de presión negativa así como proporcionar perfusión y ventilación vasculares a velocidades y presiones fisiológicas. El biorreactor permite entre otras cosas la perfusión de medios a través de la vasculatura, el movimiento de medio o aire dentro y fuera de las vías respiratorias, y la ventilación de los pulmones por medio de presión negativa (así como positiva).

El modelo tridimensional *in vitro* de tejido de pulmón de la invención es útil para investigar la biología del desarrollo del pulmón. Además, el modelo es útil para entre otras cosas, el descubrimiento de fármacos, pruebas de toxicidad, patología de enfermedades, y similares.

La invención también se refiere al descubrimiento de que puede generarse tejido de pulmón *in vitro*. El modelo *in vitro* resume la formación de estructuras reminiscentes unidades de formación alveolares compuestas por epitelio ductal fuertemente conectado con la circulación del huésped. Por consiguiente, la invención proporciona métodos y composiciones para la generación de tejidos pulmonares vascularizados como forma de medicina regenerativa.

La solicitud también da a conocer un método de alivio o tratamiento de un defecto del pulmón en un mamífero, preferiblemente un ser humano. El método comprende administrar al mamífero que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un constructo tridimensional de la invención, aliviando o tratando de ese modo el defecto del pulmón en el mamífero.

25 Definiciones

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen generalmente el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Generalmente, la nomenclatura usada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio en cultivo celular, genética molecular, química orgánica y química e hibridación de ácidos nucleicos son los bien conocidos y comúnmente empleados en la técnica.

Se usan técnicas convencionales para la síntesis de ácidos nucleicos y péptidos. Las técnicas y los procedimientos se realizan generalmente según métodos convencionales en la técnica y diversas referencias generales (por ejemplo, Sambrook y Russell, 2001, *Molecular Cloning, A Laboratory Approach*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, y Ausubel *et al.*, 2002, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York, NY), que se proporcionan a lo largo de este documento.

Los artículos “un/o” y “una” se usan en el presente documento para referirse a uno o más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, “un elemento” significa un elemento o más de un elemento.

El término “aproximadamente” lo entenderán los expertos habituales en la técnica y variará en algún grado basándose en el contexto en el que se usa.

Los términos “célula precursora”, “célula progenitora” y “célula madre” se usan de manera intercambiable en la técnica y tal como se usan en el presente documento se refieren a una célula progenitora o bien pluripotente o bien de linaje no comprometido, que potencialmente puede experimentar un número ilimitado de divisiones mitóticas para renovarse por sí misma o para producir células de progenie que se diferenciarán en el tipo celular deseado. En contraposición a las células madre pluripotentes, en general se considera que las células progenitoras de linaje comprometido no pueden dar lugar a numerosos tipos celulares que difieren de manera fenotípica entre sí. En su lugar, las células progenitoras dan lugar a uno o posiblemente dos tipos celulares de linaje comprometido.

El término “desdiferenciación”, tal como se usa en el presente documento, se refiere al retorno de una célula a un estado menos especializado. Después de la desdiferenciación, una célula de este tipo tendrá la capacidad para diferenciarse en más o diferentes tipos celulares de lo que era posible antes de la reprogramación. El proceso de diferenciación inversa (es decir, desdiferenciación) es probablemente más complicado que la diferenciación y requiere “reprogramación” de la célula para volverse más primitiva.

Tal como se usa en el presente documento, “armazón” se refiere a una estructura, que comprende un material biocompatible, que proporciona una superficie adecuada para la adherencia y proliferación de células. Un armazón puede proporcionar además estabilidad y soporte mecánicos. Un armazón puede estar en una forma o configuración particular de modo que influya o delimite una forma o conformación tridimensional adoptada por una población de

células en proliferación. Tales formas o conformaciones incluyen, pero no se limitan a, películas (por ejemplo una forma con dos dimensiones sustancialmente mayores que la tercera dimensión), cintas, cordones, láminas, discos planos, cilindros, esferas, conformaciones amorfas tridimensionales, etc.

5 Tal como se usa en el presente documento, "biocompatible" se refiere a cualquier material, que, cuando se implanta en un mamífero, no provoca una respuesta adversa en el mamífero. Un material biocompatible, cuando se introduce en un individuo, no es tóxico o dañino para ese individuo, ni induce el rechazo inmunológico del material en el mamífero.

Tal como se usa en el presente documento, "autólogo" se refiere a un material biológico derivado del mismo individuo al que va a reintroducirse más tarde el material.

10 Tal como se usa en el presente documento, "alogénico" se refiere a un material biológico derivado de un individuo genéticamente diferente de la misma especie que el individuo al que se le introducirá el material.

15 Tal como se usa en el presente documento, un "injerto" se refiere a una célula, un tejido u órgano que se implanta en un individuo, normalmente para sustituir, corregir o superar de otro modo un defecto. Un injerto puede comprender además un armazón. El tejido u órgano puede consistir en células que se originan a partir del mismo individuo; se hace referencia a este injerto en el presente documento mediante los siguientes términos intercambiables: "autoinjerto", "trasplante autólogo", "implante autólogo" e "injerto autólogo". Se hace referencia a un injerto que comprende células de un individuo genéticamente diferente de la misma especie en el presente documento mediante los siguientes términos intercambiables: "aloinjerto", "trasplante alogénico", "implante alogénico" e "injerto alogénico". Se hace referencia a un injerto de un individuo a su gemelo idéntico en el presente documento como "isoinjerto", "trasplante singénico", "implante singénico" o "injerto singénico". Un "xenoinjerto", "trasplante xenogénico" o "implante xenogénico" se refiere a un injerto de un individuo a otro de una especie diferente.

Tal como se usan en el presente documento, los términos "injerto de tejido" y "reconstrucción de tejido" se refieren ambos a implantar un injerto en un individuo para tratar o aliviar un defecto de tejido, tal como un defecto de pulmón o un defecto de tejido blando.

25 Tal como se usa en el presente documento, "aliviar" una enfermedad, un defecto, trastorno o estado significa reducir la intensidad de uno o más síntomas de la enfermedad, el defecto, trastorno o estado.

Tal como se usa en el presente documento, "tratar" significa reducir la frecuencia con que un paciente experimenta síntomas de una enfermedad, un defecto, trastorno o estado adverso, y similares.

30 Tal como se usa en el presente documento, una "cantidad terapéuticamente eficaz" es la cantidad de una composición de la invención suficiente para proporcionar un efecto beneficioso al individuo al que se administra la composición.

Tal como se usa en el presente documento, el término "medio de crecimiento" pretende referirse a un medio de cultivo que fomenta el crecimiento de células. Un medio de crecimiento contendrá generalmente suero animal. En algunos casos, el medio de crecimiento no puede contener suero animal.

35 "Medio de diferenciación" se usa en el presente documento para referirse a un medio de crecimiento celular que comprende un aditivo o carece de un aditivo de tal manera que una célula madre, célula pulmonar fetal u otra célula progenitora de este tipo, que no está totalmente diferenciada, se desarrolla para dar una célula con algunas o todas las características de una célula diferenciada cuando se incuba en el medio.

40 Tal como se usa en el presente documento, el término "producto de factor de crecimiento" se refiere a una proteína, un péptido, mitógeno, u otra molécula que tiene un efecto de crecimiento, proliferativo, diferenciativo o trófico sobre una célula. Los factores de crecimiento incluyen, pero no se limitan a, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento de fibroblastos ácido (aFGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento similar a insulina-I (IGF-I), factor de crecimiento similar a insulina-II (IGF-II), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de células endoteliales vasculares (VEGF), activina-A, proteínas morfogenéticas óseas (BMP), insulina, hormona de crecimiento, 45 eritropoyetina, trombopoyetina, interleucina 3 (IL-3), interleucina 6 (IL-6), interleucina 7 (IL-7), factor de estimulación de colonias de macrófagos, factor de células madre/ligando de c-kit, ligando de osteoprotegerina, insulina, factor de crecimiento nervioso, factor neurotrófico ciliar, citocinas, quimiocinas, morfógenos, anticuerpos neutralizantes, otras proteínas y moléculas pequeñas. Preferiblemente, el FGF se selecciona del grupo seleccionado de FGF2, FGF7, 50 FGF10, y cualquier combinación de los mismos.

Una "célula aislada" se refiere a una célula que se ha separado de otros componentes y/o células que acompañan de manera natural a la célula aislada en un tejido o mamífero.

55 Tal como se usa en el presente documento, "células pulmonares fetales" (FPC) se refieren a células aisladas del tejido de pulmón de un embrión. Una población mixta de FPC puede incluir, pero no se limita a células epiteliales, mesenquimatosas y endoteliales.

Tal como se usa en el presente documento, “célula epitelial” significa una célula que forma la superficie externa del cuerpo y reviste los órganos, las cavidades y superficies mucosas.

Tal como se usa en el presente documento, “célula endotelial” significa una célula que reviste los vasos sanguíneos y linfáticos y otras diversas cavidades corporales.

5 Tal como se usa en el presente documento, una célula “sustancialmente purificada” es una célula que está esencialmente libre de otros tipos celulares. Por tanto, una célula sustancialmente purificada se refiere a una célula que se ha purificado de otros tipos celulares con los que está normalmente asociada en el estado en que se produce de manera natural.

10 “Expansibilidad” se usa en el presente documento para referirse a la capacidad de una célula para proliferar, por ejemplo, para expandirse en número, o en el caso de una población de células, para experimentar duplicaciones de población.

15 El término “específico de pulmón” se refiere a una molécula de ácido nucleico o polipéptido que se expresa predominantemente en el pulmón en comparación con otros tejidos en el cuerpo. En una realización preferida, una molécula de ácido nucleico o polipéptido “específico de pulmón” se expresa a un nivel que es 5 veces mayor que cualquier otro tejido en el cuerpo. En una realización más preferida, la molécula de ácido nucleico o polipéptido “específico de pulmón” se expresa a un nivel que es 10 veces mayor que cualquier otro tejido en el cuerpo, más preferiblemente al menos 15 veces, 20 veces, 25 veces, 50 veces o 100 veces mayor que cualquier otro tejido en el cuerpo. Pueden medirse los niveles de molécula de ácido nucleico mediante hibridación de ácido nucleico, tal como hibridación por transferencia de tipo Northern, o PCR cuantitativa. Pueden medirse los niveles de molécula de polipéptido mediante cualquier método que se sabe que mide con exactitud los niveles de proteína, tal como análisis por inmunotransferencia de tipo Western.

20 “Proliferación” se usa en el presente documento para referirse a la reproducción o multiplicación de formas similares, especialmente de células. Es decir, la proliferación abarca la producción de un mayor número de células, y puede medirse, entre otras cosas, simplemente contando los números de células, midiendo la incorporación de ³H-timidina en la célula, y similares.

Tal como se usa en el presente documento, “ingeniería de tejidos” se refiere al proceso de generar tejidos *ex vivo* para su uso en la sustitución o reconstrucción de tejidos. Ingeniería de tejidos es un ejemplo de “medicina regenerativa”, que abarca enfoques para la reparación o sustitución de tejidos y órganos mediante la incorporación de células, genes u otros elementos estructurales biológicos, junto con materiales y tecnologías de bioingeniería.

30 Tal como se usa en el presente documento “endógeno” se refiere a cualquier material procedente de o producido dentro de un organismo, una célula o un sistema.

“Exógeno” se refiere a cualquier material introducido en o producido fuera de un organismo, una célula o un sistema.

35 “Que codifica para” se refiere a la propiedad intrínseca de secuencias de nucleótidos específicas en un polinucleótido, tal como un gen, un ADNc, o un ARNm, para servir como moldes para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en procesos biológicos que tienen o bien una secuencia de nucleótidos definida (es decir, ARNr, ARNt y ARNm) o una secuencia de aminoácidos definida y las propiedades biológicas que resultan de las mismas. Por tanto, un gen codifica para una proteína si la transcripción y traducción de ARNm correspondiente a ese gen produce la proteína en una célula u otro sistema biológico. Puede hacerse referencia a que tanto la hebra codificante, cuya secuencia de nucleótidos es idéntica a la secuencia de ARNm y se proporciona habitualmente en listas de secuencias, como la hebra no codificante, usadas como molde para la transcripción de un gen o ADNc, codifican para la proteína u otro producto de ese gen o ADNc.

40 A menos que se especifique de otro modo, una “secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos” incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas unas de otras y que codifican para la misma secuencia de aminoácidos. Las secuencias de nucleótidos que codifican para proteínas y ARN pueden incluir intrones.

45 Un “ácido nucleico aislado” se refiere a un segmento o fragmento de ácido nucleico que se ha separado de secuencias que lo flanquean en un estado en que se produce de manera natural, es decir, un fragmento de ADN que se ha eliminado de las secuencias que son normalmente adyacentes al fragmento, es decir, las secuencias adyacentes al fragmento en un genoma en que se produce de manera natural. El término también se aplica a ácidos nucleicos que se han purificado sustancialmente de otros componentes que acompañan de manera natural al ácido nucleico, es decir, ARN o ADN o proteínas, que lo acompañan de manera natural en la célula. Por tanto, el término incluye, por ejemplo, un ADN recombinante que se incorpora en un vector, en un virus o plásmido de replicación autónoma, o en el ADN genómico de una procarionota o eucariota, o que existe como molécula independiente (es decir, como ADNc o ADN genómico o fragmento de ADNc producido mediante PCR o digestión con enzimas de restricción) independiente de otras secuencias. También incluye un ADN recombinante que forma parte de un gen híbrido que codifica para una secuencia de polipéptido adicional.

En el contexto de la presente invención, se usan las siguientes abreviaturas para las bases de ácido nucleico que se producen comúnmente. "A" se refiere a adenosina, "C" se refiere a citosina, "G" se refiere a guanosina, "T" se refiere a timidina, y "U" se refiere a uridina.

5 La expresión "bajo control transcripcional" u "operativamente unido" tal como se usa en el presente documento significa que el promotor está en la ubicación y orientación correctas con relación a los polinucleótidos para controlar la iniciación por ARN polimerasa y la expresión de los polinucleótidos.

10 Tal como se usa en el presente documento, el término "secuencia promotora/reguladora" significa una secuencia de ácido nucleico que se requiere para la expresión de un producto génico operativamente unido a la secuencia promotora/reguladora. En algunos casos, esta secuencia puede ser la secuencia promotora central y en otros casos, esta secuencia también puede incluir una secuencia potenciadora y otros elementos reguladores que se requieren para la expresión del producto génico. La secuencia promotora/reguladora puede ser, por ejemplo, una que exprese el producto génico de manera específica de tejido.

15 Un promotor "constitutivo" es una secuencia de nucleótidos que, cuando está operativamente unida con un polinucleótido que codifica para o especifica un producto génico, hace que se produzca el producto génico en una célula en condiciones en su mayoría o totalmente fisiológicas de la célula.

Un promotor "inducible" es una secuencia de nucleótidos que, cuando está operativamente unida con un polinucleótido que codifica para o especifica un producto génico, hace que se produzca el producto génico en una célula sustancialmente sólo cuando está presente en la célula un inductor que corresponde al promotor.

20 El término "tejido", tal como se usa en el presente documento incluye, pero no se limita a, hueso, tejido neural, tejido conjuntivo fibroso incluyendo tendones y ligamentos, cartílago, duramadre, pericardio, músculo, pulmón, válvulas del corazón, venas y arterias y otra vasculatura, dermis, tejido adiposo o tejido glandular.

Un promotor "específico de tejido" es una secuencia de nucleótidos que, cuando está operativamente unida con un polinucleótido que codifica para o especifica un producto génico, hace que se produzca el producto génico en una célula sustancialmente sólo si la célula es una célula del tipo de tejido correspondiente al promotor.

25 Un "vector" es una composición de materia que comprende un ácido nucleico aislado y que puede usarse para insertar el ácido nucleico aislado en el interior de una célula. Se conoce numerosos vectores en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a, polinucleótidos lineales, polinucleótidos asociados con compuestos iónicos o anfífilos, plásmidos y virus. Por tanto, el término "vector" incluye un virus o un plásmido de replicación autónoma. El término también debe interpretarse que incluye compuestos no plasmídicos y no virales que facilitan la transferencia del ácido nucleico a las células, tales como, por ejemplo, compuestos de polilisina, liposomas, y similares. Los ejemplos de vectores virales incluyen, pero no se limitan a, vectores adenovirales, vectores de virus adenoasociados, vectores retrovirales, y similares.

30 "Vector de expresión" se refiere a un vector que comprende un polinucleótido recombinante que comprende secuencias de control de la expresión operativamente unidas a una secuencia de nucleótidos que va a expresarse. Un vector de expresión comprende suficientes elementos de acción *in cis* para la expresión; pueden insertarse otros elementos para la expresión por la célula huésped o en un sistema de expresión *in vitro*. Los vectores de expresión incluyen todos los conocidos en la técnica, tal como cósmidos, plásmidos (es decir, desnudos o contenidos en liposomas) y virus que incorporan el polinucleótido recombinante.

35 Tal como se usan en el presente documento, los términos "sujeto" y "paciente" se usan de manera intercambiable. Tal como se usa en el presente documento, un sujeto es preferiblemente un mamífero tal como un animal distinto de los primates (por ejemplo, vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, ratas, etc.) y un primate (por ejemplo, mono y ser humano), lo más preferiblemente un ser humano.

Descripción

45 La presente invención proporciona un tejido pulmonar tridimensional creado por ingeniería y métodos de preparación del tejido pulmonar tridimensional. El tejido pulmonar es un tejido de pulmón. En una realización, el tejido pulmonar creado por ingeniería presenta morfogénesis de ramificación ejemplificado mediante tejido pulmonar natural. Por tanto, la invención proporciona un modelo *in vitro* que imita el tejido pulmonar natural. El modelo tridimensional de tejido pulmonar *in vitro* es útil, entre otras cosas, para el descubrimiento de fármacos, pruebas de toxicidad, patología de enfermedades, y similares.

50 La invención se basa en el descubrimiento de un procedimiento útil para la descelularización de tejido de pulmón usando una técnica que extirpa material celular pero que conserva componentes clave de la matriz extracelular. El desarrollo de una matriz de pulmón descelularizada es importante como armazón para aplicaciones de ingeniería de tejidos.

55 La divulgación incluye un método para descelularizar sustancialmente un tejido u órgano. Preferiblemente, el método reduce significativamente o elimina la inmunogenicidad del tejido u órgano de tal manera que tras el trasplante, el

tejido u órgano no se rechaza por el sistema inmunitario del receptor. El método incluye extirpar el tejido de un donante, procesar el tejido para retirar sustancialmente todas las células del tejido u órgano.

5 El método de la invención incluye repoblar el armazón descelularizado a través de la siembra con células, incluyendo pero sin limitarse a células madre, células fetales y similares, para la implantación en el receptor. Preferiblemente, el armazón descelularizado se siembra con células no inmunogénicas. En una realización, el armazón descelularizado se siembra con células que son autólogas para el receptor pretendido. Dependiendo del tipo de tejido que esté tratándose y que vaya a sustituirse, se seleccionan diferentes células madre conocidas en la técnica o que lleguen a conocerse de ahora en adelante de tal manera que se formen tejidos apropiados tras la implantación en un receptor del implante con siembra.

10 En algunos casos, el tejido pulmonar tridimensional creado por ingeniería comprende células cultivadas sobre el tejido. Puede usarse cualquier célula adecuada para el cultivo sobre el tejido descelularizado de la invención. En algunos casos, se cultivan células madre sobre el tejido descelularizado para la regeneración de tejido de pulmón. En algunos casos, se cultivan células pulmonares fetales o neonatales (NPC) sobre el tejido descelularizado. En algunos casos, se usa una población mixta de NPC, en la que la población de NPC incluye, pero no se limita a
15 células epiteliales, células mesenquimatosas y células endoteliales.

Después de la siembra, las células sobre el armazón se someten opcionalmente a un medio de expansión o a un medio de diferenciación o se cultivan en presencia de factores de crecimiento específicos de tejido. La composición se implanta entonces en un sujeto que lo necesita.

20 El sujeto puede ser un mamífero, pero es preferiblemente un ser humano y la fuente de las células para crecimiento e implantación es cualquier mamífero, preferiblemente un ser humano. La composición implantada soporta crecimiento celular adicional *in vivo*, proporcionando por tanto la reconstrucción de tejido. Por consiguiente, la solicitud da a conocer el uso de tejido pulmonar tridimensional creado por ingeniería para terapias de injerto de tejido.

25 La solicitud también da a conocer la generación de tejido pulmonar *in vivo*. Preferiblemente, se genera tejido pulmonar vascularizado *in vivo*. En un aspecto de la divulgación, las células pulmonares fetales se administran en el contexto del tejido descelularizado a un mamífero para facilitar la formación de tejido pulmonar *in vivo*.

30 En la presente invención, se demuestra que el tejido descelularizado puede sembrarse con células adecuadas, tales como células pulmonares neonatales o adultas, y la composición resultante puede usarse como modelo de tejido pulmonar vascularizado tridimensional para pruebas preclínicas *in vitro* farmacológicas y fisiológicas, y científicas. Además, el tejido descelularizado puede sembrarse con células adecuadas, tales como células pulmonares neonatales o células pulmonares autólogas, y la composición resultante puede usarse para la reconstrucción de tejido *in vivo*.

35 Las composiciones y los métodos de la presente invención tienen innumerables aplicaciones útiles. Las composiciones pueden usarse en métodos terapéuticos para aliviar o tratar defectos de tejido en un individuo. Las composiciones también pueden usarse *in vitro* o *in vivo* para identificar compuestos terapéuticos y por tanto pueden tener potencial terapéutico.

Descelularización

40 La presente invención proporciona un avance con respecto a las técnicas de ingeniería de tejidos conocidas en la técnica. Específicamente, la presente invención proporciona un método de preparación de armazones de tejido creados por ingeniería usando un tejido descelularizado como fuente de partida, preferiblemente un tejido natural descelularizado derivado de un mamífero.

45 El procedimiento de descelularización se basa en una metodología química. La disolución química o denominada si no disolución de descelularización usada para la descelularización incluye generalmente al menos una disolución hipertónica, un detergente y un agente quelante. Preferiblemente, la disolución hipertónica es una disolución hipertónica de cloruro de sodio. Preferiblemente, el detergente es un detergente zwitteriónico tal como CHAPS. Preferiblemente, el agente quelante es EDTA.

50 En una realización, la disolución de descelularización puede incluir un tampón (por ejemplo, PBS) para la compatibilidad osmótica con las células. En algunos casos, la disolución de descelularización también puede incluir enzimas tales como, sin limitación, uno o más colagenasas, uno o más dispasas, una o más ADNasas o una proteasa tal como tripsina. En algunos casos, la disolución de descelularización también o alternativamente puede incluir inhibidores de una o más enzimas (por ejemplo, inhibidores de proteasas, inhibidores de nucleasas, y/o inhibidores de colagenasas).

55 El método para descelularizar un tejido de la invención incluye perfundir el tejido con la disolución de descelularización. La presión a la que se perfunde la disolución de descelularización a través del tejido puede ajustarse a la presión deseada. Preferiblemente, la disolución de descelularización se perfunde a través del tejido a una presión de perfusión inferior a aproximadamente 30 mmHg. Más preferiblemente, la disolución de

descelularización se perfunde a través del tejido a presiones inferiores a aproximadamente 20 mmHg.

La disolución de descelularización puede introducirse en las vías respiratorias del tejido de pulmón para realizar la retirada de células.

5 En una realización, el tejido descelularizado de la invención consiste esencialmente en el componente de la matriz extracelular (ECM) de todas o la mayor parte 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), glucosaminoglucanos, sustancia fundamental, fibras reticulares y trombospondina, que pueden permanecer organizados como estructuras definidas tales como la lámina basal. Se define la descelularización satisfactoria como
10 la ausencia de miofilamentos, células endoteliales, células de músculo liso, células epiteliales y núcleos detectables en secciones histológicas usando procedimientos de tinción histológica convencionales. Preferiblemente, pero no necesariamente, también se han retirado desechos de células residuales del tejido descelularizado.

15 El procedimiento de descelularización de un tejido natural conserva la estructura tridimensional nativa del tejido. Es decir, la morfología y la arquitectura del tejido, incluyendo componentes de la ECM que se mantienen durante y tras el procedimiento de descelularización. La morfología y la arquitectura de la ECM pueden examinarse visual y/o histológicamente. Por ejemplo, la lámina basal sobre la superficie exterior de un órgano sólido o dentro de la vasculatura de un órgano o tejido no debe retirarse ni dañarse significativamente debido a la descelularización. Además, las fibrillas de la ECM deben ser similares a o significativamente inalteradas con respecto a las de un órgano o tejido que no se ha descelularizado.

20 En una realización, pueden aplicarse uno o más compuestos en o sobre un tejido descelularizado para, por ejemplo, conservar el tejido descelularizado, o para preparar el tejido descelularizado para recelularización y/o para ayudar a estimular células durante el procedimiento de recelularización. Tales compuestos incluyen, pero no se limitan a, uno o más factores de crecimiento (por ejemplo, VEGF, DKK-1, FGF, BMP-1, BMP-4, SDF-1, IGF y HGF), agentes de modulación inmunitaria (por ejemplo, citocinas, glucocorticoides, antagonista de IL2R, antagonistas de leucotrienos),
25 y/o factores que modifican la cascada de coagulación (por ejemplo, aspirina, proteínas de unión a heparina y heparina). Además, un órgano o tejido descelularizado puede tratarse adicionalmente con, por ejemplo, irradiación (por ejemplo, UV, gamma) para reducir o eliminar la presencia de cualquier tipo de microorganismo que quede sobre o en un tejido descelularizado.

30 El uso de la disolución de descelularización de la invención para generar un tejido descelularizado proporciona un modo controlado y preciso de destruir células de un tejido, mientras se deja la ECM subyacente, incluyendo vascularización, y otras características morfológicas macroscópicas del tejido original intacto. Los armazones descelularizados son entonces adecuados para la siembra con células apropiadas. Cuando se realiza el proceso *in vitro*, el tejido sembrado es adecuado para la implantación en el receptor como tejido de sustitución. Además de los propios tejidos descelularizados, la invención incluye métodos de fabricación de tejidos creados por ingeniería
35 contruidos a partir de tales armazones.

La presente invención proporciona un método adecuado para producir un armazón de tejido para su uso en ingeniería de tejidos. Aunque la fuente del tejido no está limitada, en realizaciones a modo de ejemplo, el tejido procede de un animal relativamente grande o un animal que se reconoce que tiene una anatomía similar (con respecto al tejido de interés) a la de un ser humano, tal como un cerdo, una vaca, un caballo, un mono o un simio.
40 En algunas realizaciones, la fuente del tejido es humana, cuyo uso puede reducir la posibilidad de rechazo de tejidos creados por ingeniería basados en el armazón. En realizaciones preferidas, el método deja intactas estructuras vasculares del tejido, tales como la arquitectura alveolar con la conservación de los tabiques alveolares. Tal como se usa en el presente documento, el término "intacto" se refiere a un estado mediante el cual un elemento puede realizar su función original en un grado sustancial.

45 En una realización, el pulmón descelularizado conserva varias características clave de la matriz normal del pulmón. Por ejemplo, el pulmón descelularizado comprende al menos uno o más de colágeno, elastina, fibronectina y proteoglicano.

El tejido descelularizado no conserva ningún antígeno del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I o II, por tanto el tejido no provoca una respuesta inmunitaria adversa cuando se administra a un receptor.

50 El tejido descelularizado conserva propiedades mecánicas del pulmón nativo normal. El tejido descelularizado también conserva algunas de las funciones de barrera del pulmón nativo normal.

Biorreactor

La solicitud da a conocer un sistema (por ejemplo, un biorreactor) para la descelularización y/o recelularización de tejido. El biorreactor permite el mantenimiento de la viabilidad celular, el estado de diferenciación celular y la morfología del pulmón. Los armazones descelularizados, cuando se cultivan en el biorreactor con una fuente de células adecuada, puede soportar la adherencia y proliferación de una amplia gama de tipos celulares, incluyendo células pulmonares endoteliales, epiteliales y mesenquimatosas. El biorreactor incorpora las características clave del

entorno vivo. El biorreactor se diseñó para permitir modificaciones para optimizar los procedimientos de descelularización y/o recelularización. En una divulgación, el biorreactor puede perfundir medios a través de la vasculatura a una velocidad especificada por el usuario y dentro de los niveles fisiológicos de flujo y presión de un mamífero. En otra divulgación, el biorreactor puede ventilar el tejido (por ejemplo, pulmón) con aire o medios a través de la tráquea. Preferiblemente, se usa ventilación con presión negativa para que concuerde con las condiciones fisiológicas normales, aunque también puede realizarse la ventilación usando presión positiva. En aún otra divulgación, el biorreactor puede permitir diferentes tipos de medios para bañar los compartimentos vasculares y de las vías respiratorias del tejido. En otra divulgación, el biorreactor permite el intercambio de gases en el medio de cultivo, mientras que se cumplen simultáneamente los requisitos deseados para la ventilación. En otra divulgación, el biorreactor tiene orificios para permitir mediciones de presión, por ejemplo mediciones de presiones de la arteria pulmonar y traqueal. Preferiblemente, las presiones están dentro de valores fisiológicos normales. En otra divulgación, el biorreactor tiene medios para permitir el intercambio de medios de modo periódico.

El biorreactor dado a conocer incluye generalmente al menos un dispositivo de canulación para canular un tejido, un aparato de perfusión para perfundir medios a través de la(s) cánula(s), y medios (por ejemplo, un sistema de contención) para mantener un entorno estéril para el órgano o tejido. Un dispositivo de canulación incluye generalmente tubos huecos de tamaño apropiado para la introducción en un vaso, conducto y/o una cavidad de un tejido. Normalmente, se canulan uno o más vasos, conductos, y/o cavidades en un tejido. Un aparato de perfusión puede incluir un recipiente contenedor para el líquido (por ejemplo, un medio de perturbación celular) y un mecanismo para mover el líquido a través del órgano (por ejemplo, una bomba, presión de aire, gravedad) a través de la una o más cánulas. La esterilidad de un tejido durante la descelularización y/o recelularización puede mantenerse usando los métodos comentados en otra parte del presente documento.

El biorreactor puede usarse para descelularizar y recelularizar tejidos tal como se describe en el presente documento. El procedimiento puede monitorizarse para detectar determinadas características de perfusión (por ejemplo, presión, volumen, patrón de flujo, temperatura, gases, pH), fuerzas mecánicas (por ejemplo, tensión y movimiento de la pared ventricular) y estimulación eléctrica (por ejemplo, electroestimulación). La eficacia de la perfusión puede evaluarse en el efluente y en secciones de tejido. Pueden monitorizarse el volumen de perfusión, patrón de flujo, temperatura, presiones parciales de O₂ y CO₂ y pH usando métodos convencionales.

Pueden usarse sensores para monitorizar el biorreactor y/o el tejido. Pueden usarse mediciones de sonomicrometría, micromanometría y/o conductancia para adquirir la presión-volumen. Por ejemplo, pueden usarse sensores para monitorizar la presión de un líquido que se mueve a través de un órgano o tejido canulado; la temperatura ambiental en el sistema y/o la temperatura del órgano o tejido; el pH y/o la velocidad de flujo de un líquido que se mueve a través del órgano o tejido canulado; y/o la actividad biológica de un tejido en recelularización. Además de tener sensores para monitorizar tales características, un sistema para la descelularización y/o recelularización de un tejido también puede incluir medios para mantener o ajustar tales características. Los medios para mantener o ajustar tales características pueden incluir componentes tales como un termómetro, un termostato, electrodos, sensores de presión, válvulas de rebosamiento, válvulas para cambiar la velocidad de flujo de un líquido, válvulas para abrir y cerrar conexiones de fluido a disoluciones usadas para cambiar el pH de una disolución, un balón, un marcapasos externo y/o una cámara de cumplimiento. Para ayudar a garantizar condiciones estables (por ejemplo, de temperatura), las cámaras, los depósitos y tubos pueden tener camisas de agua.

El biorreactor puede proporcionar suficiente suministro de nutrientes y estimulación mecánica al tejido de pulmón como para soportar la supervivencia y diferenciación celular. El biorreactor puede usarse para el cultivo de tejido de pulmón *in vitro* y para el cultivo de tejido de pulmón creado por ingeniería. Preferiblemente, el biorreactor puede usarse para cultivar tejido de pulmón creado por ingeniería usando los armazones de pulmón descelularizado de la invención.

El desarrollo de un biorreactor que puede producir el cultivo *in vitro* de segmentos verdaderamente tridimensionales de tejido de pulmón es una etapa importante en el desarrollo de tejido de pulmón creado por ingeniería clínicamente útil. Por ejemplo, el crecimiento y la maduración del tejido de pulmón creado por ingeniería pueden tener lugar en el biorreactor antes de la implantación del pulmón creado por ingeniería en un receptor, potenciando de ese modo la funcionalidad del tejido de pulmón implantado final *in vivo*. Además, el biorreactor para el cultivo de pulmón *in vitro* puede usarse para ayudar al estudio de la biología, fisiología y el desarrollo pulmonar. Es decir, pueden estudiarse las interacciones de células endoteliales y epiteliales de pulmón para formar la barrera alveolo-capilar usando el tejido de pulmón creado por ingeniería y el biorreactor. Un experto en la técnica podría estudiar el comportamiento del pulmón en un entorno más controlado que los diversos modelos animales usados actualmente. El tejido de pulmón creado por ingeniería y el biorreactor también podrían usarse para pruebas farmacológicas e investigación en tejido humano o animal antes de proceder a ensayos en seres humanos o animales que llevan mucho tiempo y son costosos.

Composiciones

Las composiciones de la invención incluyen un tejido de pulmón creado por ingeniería. Preferiblemente, el tejido de pulmón creado por ingeniería presenta una cualquiera o más de las siguientes propiedades: 1) vasculatura y vías respiratorias, en las que existe una vasculatura perfundida evidente y un árbol respiratorio evidente que puede

ventilarse; 2) intercambio de gases, en el que el pulmón creado por ingeniería puede intercambiar suficiente gas entre los compartimentos de las vías respiratorias y vascular para soportar las necesidades fisiológicas del receptor; lo más preferiblemente, la presión parcial de oxígeno en la vena pulmonar es de al menos 50 mmHg; 3) mecánica, en la que el tejido creado por ingeniería es lo suficientemente resistente como para resistir todos los movimientos necesarios, en particular movimientos respiratorios y perfusión vascular, así como manipulación durante la implantación quirúrgica; 4) inmunogenicidad, en la que el tejido de pulmón creado por ingeniería no provoca una respuesta inmunitaria cuando se implanta en el receptor.

Las composiciones y los métodos de la presente invención pueden ponerse en práctica usando cualquier célula adecuada. Preferiblemente, la célula o células adecuadas son regenerativas y pueden usarse para recelularizar el tejido descelularizado de la invención. Un ejemplo de una célula regenerativa incluye, pero no se limita a, una célula madre, una célula madre embrionaria, una célula madre adulta, una célula sanguínea de cordón umbilical, una célula madre o progenitora derivada de tejido, una célula madre o progenitora derivada de médula ósea, una célula madre o progenitora derivada de la sangre, una célula madre mesenquimatosa (MSC), una célula derivada de músculo esquelético, una célula progenitora adulta multipotente (MAPC), una célula pulmonar fetal, células epiteliales pulmonares diferenciadas, células pulmonares progenitoras, células progenitoras vasculares, células vasculares diferenciadas y similares. Células regenerativas adicionales que pueden usarse incluyen células madre derivadas de médula ósea tales como células mononucleares de médula ósea (BM-MNC), células madre o progenitoras endoteliales o vasculares, y células madre derivadas de sangre periférica tales como células progenitoras endoteliales (EPC).

Preferiblemente, la célula adecuada se aísla de un mamífero, más preferiblemente un primate y más preferiblemente todavía, un ser humano. Las células útiles en los métodos de la presente invención se aíslan usando métodos comentados en el presente documento, por ejemplo en la sección de ejemplos, o mediante cualquier método conocido en la técnica. Tras el aislamiento, se cultivan células adecuadas en un medio de cultivo.

Como ejemplo no limitativo, las células pulmonares neonatales (NPC) se describen en más detalle con respecto al cultivo de las células. Sin embargo, un experto en la técnica reconocerá que las condiciones de cultivo pueden modificarse para la célula adecuada. Las formulaciones de medios que soporta el crecimiento de células pulmonares incluyen, pero no se limitan a, medio esencial mínimo de Eagle, ADC-1, LPM (libre de albúmina sérica bovina), F10 (HAM), F12 (HAM), DCCM1, DCCM2, RPMI 1640, medio BGJ (con y sin modificación de Fitton-Jackson), medio basal de Eagle (BME-con la adición de base de la sal de Earle), medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM-sin suero), Yamane, IMEM-20, medio de Eagle con modificación de Glasgow (GMEM), medio Leibovitz L-15, medio de McCoy 5A, medio M199 (M199E-con base de la sal de Earle), medio M199 (M199H-con base de la sal de Hank), medio esencial mínimo de Eagle (MEM-E-con base de la sal de Earle), medio esencial mínimo de Eagle (MEM-H-con base de la sal de Hank) y medio esencial mínimo de Eagle (MEM-NAA con aminoácidos no esenciales), y similares.

Ejemplos no limitativos adicionales de medios útiles en los métodos de la invención pueden contener suero fetal de bovinos u otras especies a una concentración de al menos el 1% a aproximadamente el 30%, preferiblemente de al menos aproximadamente el 5% al 15%, lo más preferiblemente de aproximadamente el 10%. Puede estar presente extracto embrionario de bovinos u otras especies a una concentración de aproximadamente el 1% al 30%, preferiblemente de al menos aproximadamente el 5% al 15%, lo más preferiblemente de aproximadamente el 10%.

Normalmente, el medio de cultivo de NPC comprende un medio de base, suero y un antibiótico/antimicótico. Un medio de base preferido es DMEM/F12 (1:1). El suero preferido es suero bovino fetal (FBS) pero pueden usarse otros sueros, incluyendo suero de caballo o suero humano. Preferiblemente se añadirá hasta el 20% de FBS al medio anterior para soportar el crecimiento de NPC. Sin embargo, puede usarse un medio definido si se identifican los factores de crecimiento, citocinas y hormonas necesarios en FBS para el crecimiento de NPC y se proporcionan en las concentraciones apropiadas en el medio de crecimiento. Se reconoce además que pueden añadirse componentes adicionales al medio de cultivo. Tales componentes incluyen, pero no se limitan a, antibióticos, antimicóticos, albúmina, factores de crecimiento, aminoácidos, y otros componentes conocidos en la técnica para el cultivo de células. Los antibióticos que pueden añadirse al medio incluyen, pero no se limitan a, penicilina y estreptomina.

La concentración de penicilina en el medio de cultivo es de aproximadamente 10 a aproximadamente 200 unidades por ml. La concentración de estreptomina en el medio de cultivo es de aproximadamente 10 a aproximadamente 200 µg/ml. Sin embargo, no debe interpretarse en modo alguno que la invención esté limitada a ningún medio individual para el cultivo de NPC. Más bien, puede usarse cualquier medio que pueda soportar células pulmonares en cultivo tisular.

Además, el medio de cultivo de NPC puede complementarse con al menos un factor de crecimiento. Preferiblemente el factor de crecimiento es factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Por ejemplo, cualquier combinación de FGF10, FGF7, FGF2 puede complementarse con el medio de cultivo de NPC. Una concentración preferida de FGF7 es de aproximadamente 0,1-100 ng/ml (y cualquier número entero entremedias), más preferiblemente la concentración es de aproximadamente 10 ng/ml. Una concentración preferida de FGF10 es de aproximadamente 1-200 ng/ml (y cualquier número entero entremedias), más preferiblemente la concentración es de aproximadamente

25 ng/ml. Una concentración preferida de FGF2 es de aproximadamente 1-200 ng/ml (y cualquier número entero entremedias), más preferiblemente la concentración es de aproximadamente 25 ng/ml.

Tras el aislamiento, pueden incubarse NPC en medio de cultivo, en un aparato de cultivo durante un periodo de tiempo o hasta que las células alcanzan la confluencia antes de hacer pasar las células a otro aparato de cultivo.

5 Tras la siembra en placa inicial, las células pueden mantenerse en cultivo durante un periodo de aproximadamente 6 días para producir la población del pase 0 (P0). Las células pueden someterse a pases durante un número indefinido de veces, comprendiendo cada pase cultivar las células durante aproximadamente 6-7 días, tiempo durante el cual el tiempo de duplicación celular puede oscilar entre aproximadamente 3 y aproximadamente 5 días. El aparato de cultivo puede ser cualquier aparato de cultivo usado comúnmente en el cultivo de células *in vitro*.

10 Pueden cultivarse NPC en medio de cultivo complementado con FGF durante un periodo de tiempo o hasta que las células alcanzan un determinado nivel de confluencia. Preferiblemente, el nivel de confluencia es mayor del 70%. Más preferiblemente, el nivel de confluencia es mayor del 90%. Un periodo de tiempo puede ser cualquier tiempo adecuado para el cultivo de células *in vitro*. Puede sustituirse el medio de cultivo de NPC durante el cultivo de NPC en cualquier momento. Preferiblemente, el medio de cultivo se sustituye cada de 3 a 4 días. Entonces se recogen las NPC del aparato de cultivo tras lo cual pueden usarse inmediatamente o someterse a criopreservación para almacenarse para su uso a un momento posterior. Puede recogerse las NPC mediante tripsinización, tratamiento con EDTA, o cualquier otro procedimiento usado para recoger células de un aparato de cultivo.

15 Las NPC descritas en el presente documento pueden someterse a criopreservación según procedimientos de rutina. Preferiblemente, de aproximadamente uno a diez millones de células se someten a criopreservación en medio de cultivo que contiene DMSO al 10% en fase de vapor de N₂ líquido. Pueden descongelarse células congeladas mediante agitación en un baño de 37°C, resuspenderse en medio de crecimiento nuevo, y expandirse según se describió anteriormente.

25 La invención también proporciona células que "siembran" el armazón. Las NPC pueden cultivarse sobre el armazón. Las células también pueden diferenciarse *in vitro* mediante cultivo de las células en medio de diferenciación. Alternativamente, las células pueden diferenciarse *in vivo* cuando establecen contacto con un tejido dentro del mamífero o cuando las células están suficientemente cerca de un tejido como para verse influidas por sustancias (por ejemplo, factores de crecimiento, enzimas u hormonas) liberadas desde el tejido. En otras palabras, las NPC de la matriz pueden establecer contacto con un tejido, tal como pulmón, en virtud de la recepción de señales desde el tejido. Tal señalización se produciría, por ejemplo, cuando un receptor sobre la superficie de una NPC, o sobre la superficie de una célula que desciende de una NPC, se une a y transduce una señal de una molécula tal como un factor de crecimiento, una enzima u hormona que se liberó por un tejido dentro del mamífero. Estos agentes guían la diferenciación de modo que las NPC llegan a expresar algunas y posiblemente la mayoría (si no todas) de las mismas proteínas expresadas normalmente por células diferenciadas en el tejido en que se han colocado.

30 Alternativamente, o además, puede inducirse que se diferencien las NPC de la matriz añadiendo una sustancia (por ejemplo, un factor de crecimiento, una enzima, hormona u otra molécula de señalización) al entorno de las células. Por ejemplo, puede añadirse una sustancia a los armazones biológicos de la invención.

35 Aunque las NPC y la matriz celular asociada pueden llegar eventualmente a diferenciarse completamente, y aunque esto es deseable en algunas circunstancias (por ejemplo, cuando se usan las células para recrear un tejido histológicamente maduro y completo), no es necesario que todas las células administradas estén completamente diferenciadas para lograr un tratamiento satisfactorio; sólo es necesario que se diferencien las NPC de la matriz celular hasta un punto suficiente para tratar al mamífero. Ese punto puede alcanzarse o bien antes o bien después de administrarse la matriz al paciente.

40 Se produce diferenciación cuando una célula de la matriz expresa esencialmente el mismo fenotipo que una célula madura en el sitio de implantación. Por ejemplo, con el fin de definir esta invención, una NPC de una matriz celular, que se ha implantado en el pulmón, está diferenciada cuando expresa esencialmente las mismas proteínas expresadas por el pulmón, por ejemplo, una célula epitelial alveolar. Están disponibles comercialmente anticuerpos frente a marcadores de pulmón o si no pueden obtenerse fácilmente.

45 También pueden identificarse células diferenciadas por su morfología macroscópica y por las conexiones que forman con otras células. Por ejemplo, las células que se diferencian en células de pulmón pueden desarrollar una morfología compleja que se asemeja a los bronquiolos. Por ejemplo, la invención se basa en el descubrimiento novedoso de que cultivar las NPC sobre un armazón tridimensional puede presentar características de células de pulmón maduras.

50 El número de células que se introduce en y sobre un órgano descelularizado para generar un órgano o tejido depende tanto del órgano (por ejemplo, qué órgano, el tamaño y peso del órgano) o tejido como del tipo y la fase de desarrollo de las células regenerativas. Diferentes tipos de células pueden tener diferentes tendencias en cuanto a la densidad de población que alcanzarán esas células. De manera similar, pueden celularizarse diferentes órganos o tejidos a diferentes densidades. A modo de ejemplo, un órgano o tejido descelularizado puede sembrarse con al menos aproximadamente 1.000 (por ejemplo, al menos 10.000, 100.000, 1.000.000, 10.000.000 o 100.000.000)

células regenerativas; o pueden tener desde aproximadamente 1.000 células/mg de tejido (peso húmedo, es decir, antes de la descclularización) hasta aproximadamente 10.000.000 células/mg de tejido (peso húmedo) adheridas al mismo.

5 Pueden introducirse células en un órgano o tejido descclularizado mediante la inyección en una o más ubicaciones. Además, puede introducirse más de un tipo de célula (es decir, un cóctel de células) en un órgano o tejido descclularizado. Por ejemplo, puede inyectarse un cóctel de células en múltiples posiciones en un órgano o tejido descclularizado o pueden inyectarse diferentes tipos celulares en diferentes porciones de un órgano o tejido descclularizado. Alternativamente, o además de la inyección, pueden introducirse células regenerativas o un cóctel de células mediante perfusión en un órgano o tejido descclularizado canulado. Por ejemplo, pueden perfundirse 10 células en un órgano descclularizado usando un medio de perfusión, que puede cambiarse entonces a un medio de expansión y/o de diferenciación para inducir el crecimiento y/o la diferenciación de las células regenerativas. En el caso de un tejido de pulmón, las células pueden introducirse en cualquiera o ambos del compartimento de las vías respiratorias a través de la tráquea, o el compartimento vascular a través de la vena o arteria pulmonar.

15 Durante la recclularización, se mantiene un órgano o tejido en condiciones en las que al menos parte de las células regenerativas pueden multiplicarse y/o diferenciarse dentro de y sobre el órgano o tejido descclularizado. Esas condiciones incluyen, sin limitación, la temperatura y/o presión, actividad eléctrica y/o mecánica, la fuerza apropiadas, las cantidades apropiadas de O₂ y/o CO₂, una cantidad apropiada de humedad, y condiciones estériles o casi estériles. Durante la recclularización, el órgano o tejido descclularizado y las células adheridas al mismo se mantienen en un entorno adecuado. Por ejemplo, las células pueden requerir un complemento nutricional (por 20 ejemplo, nutrientes y/o una fuente de carbono tal como glucosa), hormonas o factores de crecimiento exógenos, y/o un pH particular.

Las células pueden ser alogénicas para un órgano o tejido descclularizado (por ejemplo, un órgano o tejido descclularizado humano sembrado con células humanas), o las células regenerativas pueden ser xenogénicas para un órgano o tejido descclularizado (por ejemplo, un órgano o tejido descclularizado porcino sembrado con células 25 humanas).

En algunos casos, un órgano o tejido generado mediante los métodos descritos en el presente documento va a trasplantarse a un paciente. En esos casos, las células usadas para recclularizar un órgano o tejido descclularizado pueden obtenerse del paciente de tal manera que las células regenerativas son autólogas para el paciente. Las células de un paciente pueden obtenerse de, por ejemplo, sangre, médula ósea, tejidos, u órganos en diferentes 30 fases de la vida (por ejemplo, de manera prenatal, de manera neonatal o de manera perinatal, durante la adolescencia o como adulto) usando métodos conocidos en la técnica. Alternativamente, las células usadas para recclularizar un órgano o tejido descclularizado pueden ser singénicas (es decir, de un gemelo idéntico) para el paciente, las células pueden ser células con compatibilidad de antígeno linfocitario humano (HLA) de, por ejemplo, un familiar del paciente o un individuo con compatibilidad de HLA no relacionado con el paciente, o las células 35 pueden ser alogénicas para el paciente de, por ejemplo, un donante sin compatibilidad de HLA.

Independientemente de la fuente de las células (por ejemplo, autólogas o no), el órgano sólido descclularizado puede ser autólogo, alogénico o xenogénico para un paciente.

En determinados casos, un tejido descclularizado puede recclularizarse con células *in vivo* (por ejemplo, después de que se haya trasplantado el tejido en un individuo). La recclularización *in vivo* puede realizarse tal como se describió 40 anteriormente (por ejemplo, inyección y/o perfusión) con, por ejemplo, cualquiera de las células descritas en el presente documento. Alternativa o adicionalmente, la siembra *in vivo* de un órgano o tejido descclularizado con células endógenas puede producirse de manera natural o estar mediada por factores suministrados al tejido descclularizado.

Modificación genética

45 La presente invención se refiere al descubrimiento de que los tejidos descclularizados de la invención pueden usarse para facilitar la terapia con células de pulmón en un mamífero.

El tejido de pulmón descclularizado puede usarse para cultivar células de pulmón deseadas tales como células epiteliales pulmonares. Ya estén modificadas genéticamente o no, las células pueden usarse para tratar una enfermedad de pulmón incluyendo pero sin limitarse a enfisema, bronquiolitis obliterante y fibrosis quística. Por 50 ejemplo, el tejido descclularizado de la invención puede usarse como sustrato para el cultivo de células epiteliales de las vías respiratorias pulmonares humanas. Las células epiteliales de las vías respiratorias humanas cultivadas pueden suministrarse a un receptor mediante instilación, inhalación o inyección traqueal, entre otras vías. Tales células que se expanden en cultivo pueden usarse para realizar la terapia en el receptor. El tejido de pulmón descclularizado (por ejemplo, tráquea) proporciona una destacada plataforma para cultivar y expandir las células epiteliales pulmonares, que son normalmente muy difíciles de hacer crecer en un entorno de cultivo celular típico, tal como plástico para cultivo tisular. 55

En el contexto de la terapia génica, las células cultivadas sobre el tejido descclularizado pueden tratarse con un gen de interés antes de la inserción de las células en el pulmón de un receptor. En algunos casos, tal inserción génica

basada en células puede presentar las ventajas significativas de otros medios de inserción génica en el pulmón, tales como inhalación de vectores de inserción génica adenovirales. Esta superioridad de la inserción génica basada en células en un huésped se deriva de la observación de que los vectores de inserción génica inhalados dan como resultado normalmente una escasa eficiencia de transducción celular, debido a barreras impuestas por la capa mucosa y el sistema inmunitario del huésped. La inserción de un gen terapéutico que se ha introducido previamente en las células evita los problemas asociados con la penetración de vectores de terapia génica en las células de pulmón del receptor.

El tejido de pulmón descelularizado de la invención proporciona un medio conveniente y eficaz para hacer crecer células de pulmón tales como células epiteliales en un estado altamente viable y diferenciado, en comparación con el cultivo sobre plástico para cultivo tisular convencional. A su vez, la expansión de células de pulmón tales como células epiteliales pulmonares sobre la matriz descelularizada proporciona un número suficientemente grande de células para que sea eficaz para terapia celular. Además, la expansión de células epiteliales de pulmón sobre la matriz descelularizada proporciona una plataforma mediante la cual se cultivan células y se tratan con vectores de terapia génica *in vitro*. Las células que se transfectan con un gen de elección *in vitro* pueden purificarse opcionalmente para seleccionar sólo aquellas células que expresan el transgén de interés, y luego introducirse en un receptor que necesita tal terapia celular. Un enfoque de este tipo podría ser de valor particular en el tratamiento de enfermedades genéticas de pulmón tales como fibrosis quística.

La solicitud da a conocer un método de tratamiento de fibrosis quística. El método incluye transfectar células de interés tales como células epiteliales con una versión normal del gen CFTR, siendo una versión mutada del mismo el gen responsable de la fibrosis quística. La inserción de tales células transfectadas en un paciente, o bien mediante instilación en la tráquea, inhalación o bien mediante otros medios de introducción, alivia las dificultades significativas que se han asociado con la inserción de vectores génicos en estos pacientes. De este modo, pueden realizarse una terapia celular e inserción génica eficaces en fibrosis quística. Sin embargo, la divulgación de la solicitud no debe limitarse a tratar sólo fibrosis quística con células transfectadas con el gen CFTR. Más bien, la solicitud da a conocer el tratamiento de cualquier enfermedad o trastorno asociados con células de pulmón.

Por consiguiente, la solicitud da a conocer el uso de células modificadas genéticamente, tales como células pulmonares, que se han cultivado sobre el tejido descelularizado de la invención. La modificación genética puede, por ejemplo, dar como resultado la expresión de genes exógenos ("transgenes") o un cambio de la expresión de un gen endógeno. Una modificación genética de este tipo puede tener beneficio terapéutico. Alternativamente, la modificación genética puede proporcionar un medio para realizar un seguimiento o identificar las células así modificadas, por ejemplo, después de la implantación de una composición de la invención en un individuo. El seguimiento de una célula puede incluir el seguimiento de la migración, asimilación y supervivencia de una célula modificada genéticamente trasplantada. La modificación genética también puede incluir al menos un segundo gen. Un segundo gen puede codificar para, por ejemplo, un gen seleccionable de resistencia a antibióticos u otro marcador seleccionable.

Las proteínas útiles para realizar el seguimiento de una célula incluyen, pero no se limitan a, proteína fluorescente verde (GFP), cualquiera de las otras proteínas fluorescentes (por ejemplo, proteínas fluorescentes verde mejorada, cian, amarilla, azul y roja; Clontech, Palo Alto, CA), u otras proteínas de marcaje (por ejemplo, LacZ, etiqueta FLAG, Myc, His₆, y similares).

Cuando el propósito de la modificación genética de la célula es para la producción de una sustancia biológicamente activa, la sustancia será generalmente una que sea útil para el tratamiento de un trastorno dado. Por ejemplo, puede desearse modificar genéticamente células de modo que secreten un determinado producto de factor de crecimiento asociado con la formación de tejido blando o hueso. También son útiles productos de factor de crecimiento para inducir el crecimiento de otros tipos celulares, endógenos relevantes para la reparación de tejido. Por ejemplo, pueden ser útiles factores de crecimiento para estimular células endoteliales capilares y/o microvasculares endógenas en la reparación de defecto de tejido blando, especialmente para defectos de mayor volumen.

Las células de la presente divulgación pueden modificarse genéticamente introduciéndose material genético exógeno en las células, para producir una molécula tal como un factor trófico, un factor de crecimiento, una citocina, y similares, lo que es beneficioso para el cultivo de las células. Además, modificándose genéticamente las células para producir una molécula de este tipo, la célula puede proporcionar un efecto terapéutico adicional al mamífero cuando se trasplanta a un mamífero que lo necesita. Por ejemplo, la célula modificada genéticamente puede secretar una molécula que es beneficiosa para células vecinas al sitio de trasplante en el mamífero.

Las células pulmonares pueden modificarse genéticamente usando cualquier método conocido por el experto en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York), y en Ausubel *et al.*, Eds, (1997, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York, NY). Por ejemplo, una célula pulmonar puede exponerse a un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que incluye un transgén, de tal manera que el ácido nucleico se introduce en la célula en condiciones apropiadas para que se exprese el transgén dentro de la célula. El transgén es generalmente un casete de expresión, que incluye un polinucleótido operativamente unido a un promotor adecuado. El polinucleótido puede codificar para una proteína, o puede codificar para ARN biológicamente activo (por ejemplo,

ARN antisentido o una ribozima). Por tanto, por ejemplo, el polinucleótido puede codificar para un gen que confiere resistencia a una toxina, una hormona (tal como hormonas de crecimiento peptídicas, factores liberadores de hormonas, hormonas sexuales, hormonas adrenocorticotróficas, citocinas (por ejemplo, interferinas, interleucinas, linfocinas), etc.), un resto de señalización intracelular unido a la superficie celular (por ejemplo, moléculas de adhesión celular, receptores de hormonas, etc.), un factor que fomenta un linaje de diferenciación dado (por ejemplo, proteína morfogenética ósea (BMP)), etc.

Dentro del casete de expresión, el polinucleótido codificante está operativamente unido a un promotor adecuado. Los ejemplos de promotores adecuados incluyen promotores procariotas y promotores virales (por ejemplo, ITR retrovirales, LTR, promotores virales de expresión precoz (IEp), tales como IEp de herpesvirus (por ejemplo, ICP4-IEp e ICP0-IEEp), IEp de citomegalovirus (CMV), y otros promotores virales, tales como promotores del virus del sarcoma de Rous (VSR) y promotores de virus de leucemia murina (VLM)). Otros promotores adecuados son promotores eucariotas, tales como potenciadores (por ejemplo, los elementos reguladores de beta-globina de conejo), promotores activas de manera constitutiva (por ejemplo, el promotor de beta-actina, etc.), promotores específicos de señal (por ejemplo, promotores inducibles tales como un promotor que responde a RU486, etc.), y promotores específicos de tejido. Está muy dentro de los conocimientos de la técnica seleccionar un promotor adecuado para dirigir la expresión génica en un contexto celular predefinido. El casete de expresión puede incluir más de un polinucleótido codificante, y puede incluir otros elementos (por ejemplo, secuencias de poliadenilación, secuencias que codifican para una señal de inserción en membrana o una secuencia líder de secreción, secuencias de entrada al ribosoma, elementos reguladores de la transcripción (por ejemplo, potenciadores, silenciadores, etc.), y similares), según se desee.

El casete de expresión que contiene el transgén debe incorporarse en un vector genético adecuado para insertar el transgén en las células. Dependiendo de la aplicación final deseada, puede emplearse así cualquiera de tales vectores para modificar genéticamente las células (por ejemplo, plásmidos, ADN desnudo, virus tales como adenovirus, virus adenoasociados, herpesvirus, lentivirus, virus del papiloma, retrovirus, etc.). Puede emplearse cualquier método de construcción del casete de expresión deseado dentro de tales vectores, muchos de los cuales se conocen bien en la técnica (por ejemplo, clonación directa, recombinación homóloga, etc.). La elección del vector determinará en gran medida el método usado para introducir el vector en las células (por ejemplo, mediante fusión de protoplastos, precipitación con fosfato de calcio, pistola génica, electroporación, transfección mediada por transportadores de lípidos o DEAE-dextrano, infección con vectores virales, etc.), que se conocen generalmente en la técnica.

Se encuentran ejemplos de técnicas suficientes para dirigir a los expertos a través de los métodos de amplificación *in vitro*, incluyendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), y otras técnicas mediadas por ADN o ARN polimerasas en Sambrook *et al.*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volúmenes 1-3 (3ª ed., Cold Spring Harbor Press, NY 2001).

Una vez que se clona el ácido nucleico para una proteína, un experto en la técnica puede expresar el/los gen(es) recombinante(s) en una variedad de células de pulmón. Se espera que los expertos en la técnica sean conocedores de los numerosos sistemas de expresión disponible para expresar el transgén deseado.

La presente invención proporciona un tejido tridimensional creado por ingeniería que imita el tejido de pulmón natural. La capacidad para crear materiales compuestos y armazones que imitan tejido de pulmón natural permite la reparación y regeneración de tejidos y colecciones de tejidos en mayor grado que los métodos de la técnica anterior, y presenta una estructura y función histológicas más exactas de lo que puede lograrse usando métodos de la técnica anterior. Por ejemplo, el tejido de pulmón creado por ingeniería comprende células que presentan estructuras de gemación y estructuras tubulares en elongación. Además, las células expresan genes implicados en morfogénesis y diferenciación epitelial de pulmón. Los genes no limitativos implicados en morfogénesis y diferenciación epitelial de pulmón incluyen genes marcadores epiteliales distales SpC y SpB, el morfógeno derivado de células mesenquimatosas FGF10, FGFr2, y factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF).

Administración

La solicitud da a conocer el uso de los tejidos creados por ingeniería en entornos tanto *in vitro* como *in vivo*. Por tanto, la solicitud da a conocer el uso de los tejidos creados por ingeniería con fines de investigación y con fines terapéuticos o médicos/veterinarios. En entornos de investigación, existe un enorme número de aplicaciones prácticas para la tecnología. Un ejemplo de tales aplicaciones es el uso de los tejidos creados por ingeniería en un modelo de cáncer *ex vivo*, tal como uno para someter a prueba la eficacia de diversas técnicas de ablación (incluyendo, por ejemplo, tratamiento de radioterapia, tratamiento de quimioterapia, o una combinación) en un laboratorio, evitando por tanto el uso de pacientes enfermos para optimizar un método de tratamiento. Por ejemplo, puede adherirse un pulmón extirpado recientemente a un biorreactor y tratar el pulmón para realizar la ablación de tejido. Otro ejemplo de un uso *in vivo* es para ingeniería de tejidos.

Los tejidos creados por ingeniería de la presente invención tienen uso *in vivo*. Entre los diversos usos, pueden mencionarse métodos de tratamiento *in vivo* de sujetos (usado de manera intercambiable en el presente documento con "pacientes", y que pretende englobar tanto seres humanos como animales). Los métodos dados a conocer de

tratamiento de sujetos comprenden implantar un tejido creado por ingeniería en o sobre la superficie de un sujeto, en el que la implantación del tejido da como resultado un cambio detectable en el sujeto. El cambio detectable puede ser cualquier cambio que puede detectarse usando los sentidos o usando dispositivos fabricados por el hombre. Aunque se prevé cualquier tipo de tratamiento por la presente divulgación (por ejemplo, tratamiento terapéutico de una enfermedad o un trastorno, tratamiento cosmético de manchas de la piel, etc.), el tratamiento es un tratamiento terapéutico de una enfermedad, un trastorno u otra dolencia de un sujeto. Como tal, un cambio detectable puede ser la detección de un cambio, preferiblemente una mejora, en al menos un síntoma clínico de una enfermedad o un trastorno que afecta al sujeto. Los métodos terapéuticos *in vivo* a modo de ejemplo incluyen la regeneración de órganos después del tratamiento para un tumor, la preparación de un lecho quirúrgico para la implantación de un dispositivo médico, injerto de piel y sustitución de parte o la totalidad de un tejido u órgano, tal como uno dañado o destruido por una enfermedad o un trastorno.

Los órganos o tejidos a modo de ejemplo incluyen: corazón, pulmón, hígado, riñón, vejiga urinaria, cerebro, oído, ojo o piel. En vista del hecho de que un sujeto puede ser un ser humano o animal, la solicitud da a conocer aplicaciones tanto médicas como veterinarias.

En una divulgación, el método comprende exponer un tejido a los métodos de descelularización de la invención para destruir células del tejido tratado y crear un almacén de tejido. El método puede comprender además sembrar el almacén de tejido con células, y permitir que proliferen las células sembradas en y sobre el almacén de tejido. La proliferación produce un tejido regenerado que contiene células sanas y funcionales.

La solicitud también da a conocer métodos de tratamiento de un paciente mediante la implantación de un tejido de pulmón creado por ingeniería en un mamífero que lo necesita. En algunos casos, el tejido de pulmón creado por ingeniería comprende células adecuadas, por ejemplo NPC. Sin embargo, la divulgación no debe limitarse a ningún tipo particular de células. Después de la implantación, las células injertadas pueden responder a señales ambientales que provocarán que se desarrollen características del tejido endógeno. Preferiblemente, las células forman estructuras de tipo alveolar histiotípicas que se componen de células epiteliales distales diferenciadas (que expresan proSpC) formando estructuras ductales. Por tanto, las células implantadas desarrollarán características que las asemejan al tejido circundante. Usando estos métodos, los almacenes biológicos pueden aumentar el tejido; los almacenes biológicos de la invención pueden usarse para ingeniería de tejidos y en cualquier entorno de ingeniería de tejidos convencional.

Por consiguiente, la solicitud da a conocer aplicaciones de regeneración de tejido. El objetivo del enfoque de terapia de regeneración de tejido es suministrar altas densidades de células competentes para la reparación (o células que pueden volverse competentes cuando se ven influidas por el entorno local) al sitio del defecto en un formato que optimice tanto la mecánica de formación de heridas como la producción eventual de neot Tejido. En un aspecto de la divulgación, la composición de la presente invención puede ser particularmente útil en métodos para aliviar o tratar defectos de tejido de pulmón en individuos. Ventajosamente, la composición de la invención proporciona la regeneración mejorada de tejido de pulmón. Específicamente, la regeneración de tejido se logra más rápidamente como resultado de la composición de la invención.

Ventajosamente, las composiciones y los métodos de la invención representan una mejora con respecto a los métodos de la técnica anterior. Preferiblemente, la composición para su uso en el tratamiento de un defecto de tejido de pulmón comprende NPC, más preferiblemente NPC sembradas sobre un almacén y cultivadas *in vitro* para generar un cultivo tridimensional, tal como se describe en otra parte del presente documento.

Modelo para el descubrimiento de fármacos

La solicitud da a conocer un método *in vitro* adecuado para permitir la evaluación de compuestos de prueba para determinar la actividad terapéutica con respecto a una enfermedad o un trastorno pulmonar. Preferiblemente, el método incluye el uso de un tejido de pulmón tridimensional creado por ingeniería.

La divulgación se basa en un modelo usando tejido descelularizado. En algunos casos, el tejido descelularizado puede sembrarse con células adecuadas. En algunos casos, se usan poblaciones mixtas de NPC que contiene células epiteliales, mesenquimatosas y endoteliales para generar el tejido de pulmón creado por ingeniería tridimensional. Por ejemplo, las NPC se colocan dentro de un tejido de pulmón descelularizado tridimensional. Por tanto, el modelo incorpora la influencia de NPC sobre el crecimiento y la comunicación entre células con células vecinas. El tejido de pulmón tridimensional imita a un tejido de pulmón natural, por ejemplo el tejido de pulmón creado por ingeniería presenta morfogénesis de ramificación ejemplificada por el tejido de pulmón natural.

El modelo es útil para someter a prueba fármacos con respecto a la patología de un tejido de pulmón. Además, el modelo puede usarse para examinar los efectos de vehículos de administración particulares para agentes terapéuticos con respecto a la patología de tejido de pulmón, por ejemplo, para comparar los efectos del mismo agente administrado mediante diferentes sistemas de administración, o simplemente para evaluar si un propio vehículo de administración (por ejemplo, un vector viral) puede afectar a la patología del pulmón.

La solicitud da a conocer un método *in vitro* para seleccionar un agente de prueba por la capacidad del agente de prueba para modular la salud de un tejido de pulmón. El método comprende poner en contacto un agente de prueba

con un modelo de tejido de pulmón tridimensional creado por ingeniería y medir el efecto que tiene el agente de prueba sobre el modelo de tejido de pulmón. Cualquier alteración del modelo en presencia del agente de prueba es una indicación de que el agente de prueba puede modular la salud de un tejido de pulmón.

5 La solicitud da a conocer además un método *in vitro* para observar un efecto que tiene un agente de prueba sobre un tejido de pulmón, que comprende las etapas de:

a) proporcionar al menos un modelo de tejido de pulmón tridimensional, en el que se pretende que el modelo realice un modelado de tejido de pulmón normal;

b) poner en contacto el agente de prueba con el modelo de tejido de pulmón; y

c) observar el efecto que tiene el agente de prueba sobre el modelo de tejido de pulmón.

10 El modelo de tejido es un constructo que comprende una red tridimensional de células sobre un armazón, por ejemplo una matriz de colágeno, y al menos una célula de prueba. El método comprende observar el efecto del agente de prueba sobre la patología del tejido de pulmón. Sin embargo, el método puede comprender además la etapa de observar el efecto del agente de prueba sobre tipos celulares individuales del tejido de pulmón.

15 El agente de prueba puede ser cualquier agente incluyendo agentes químicos (tales como toxinas), productos farmacéuticos, péptidos, proteínas (tales como anticuerpos, citocinas, enzimas, etc.), y ácidos nucleicos, incluyendo medicamentos génicos y genes introducidos, que pueden codificar para agentes terapéuticos tales como proteínas, agentes antisentido (es decir, ácidos nucleicos que comprenden una secuencia complementaria a un ARN diana expresado en un tipo celular diana, tal como iARN o ARNip), ribozimas, etc. Adicional o alternativamente, el agente de prueba puede ser un agente físico tal como radiación (por ejemplo, radiación ionizante, luz UV o calor); estos pueden someterse a prueba solo o en combinación con agentes químicos y otros.

20 El modelo también puede usarse para someter a prueba vehículos de administración. Estos pueden ser de cualquier forma, desde formulaciones farmacéuticas convencionales, hasta vehículos para inserción génica. Por ejemplo, el modelo puede usarse para comparar los efectos sobre un efecto terapéutico del mismo agente administrado mediante dos o más sistemas de administración diferentes (por ejemplo una formulación de depósito y una formulación de liberación controlada). También puede usarse para investigar si un vehículo particular podría tener efectos por sí mismos sobre el tejido de pulmón. A medida que aumente el uso de agentes terapéuticos basados en genes, los problemas de seguridad asociados con los posibles diversos sistemas de administración se volverán cada vez más importantes. Por tanto los modelos dados a conocer en el presente documento pueden usarse para investigar las propiedades de sistemas de administración para agentes terapéuticos de ácido nucleico, tales como ADN o ARN desnudos, vectores virales (por ejemplo, vectores retrovirales o adenovirales), liposomas, etc. Por tanto el agente de prueba puede ser un vehículo de administración de cualquier tipo apropiado con o sin algún agente terapéutico asociado.

35 El agente de prueba puede añadirse al modelo que va a someterse a prueba usando cualquier medio adecuado. Por ejemplo, el agente de prueba puede añadirse gota a gota sobre la superficie del modelo y permitirse que difunda al interior o entre de otro modo en el modelo, o puede añadirse al medio de nutrientes y permitirse que difunda a través del gel de colágeno. El modelo también es adecuado para someter a prueba los efectos de agentes físicos tales como radiación ionizante, luz UV o calor solos o en combinación con agentes químicos (por ejemplo, en terapia fotodinámica).

40 Puede lograrse la observación del efecto que tiene el agente de prueba sobre el modelo usando una variedad de métodos. Por ejemplo, un agente particular puede inducirse que una célula entre en apoptosis. Los cambios detectables en la célula pueden comprender cambios del área, volumen, conformación, morfología, expresión de marcadores (por ejemplo, expresión de marcadores de superficie celular) de la célula u otra característica adecuada, tal como fragmentación cromosómica. También puede ser monitorizarse el número de células para observar los efectos de un agente de prueba sobre la proliferación celular; esto puede analizarse directamente, por ejemplo contando el número de un tipo celular particular presente, o indirectamente, por ejemplo midiendo el tamaño de una masa celular particular. Estos pueden observarse directa o indirectamente en el modelo intacto usando, por ejemplo, una tinción de células fluorescente adecuada. Esto puede ser mediante marcaje previo de las células con colorantes vitales o marcadores fluorescentes introducidos genéticamente (por ejemplo, proteínas fluorescentes verdes) para el análisis en serie del modelo vivo o mediante fijación y marcaje posterior con sustancias fluorescentes tales como yoduro de propidio o anticuerpos marcados de manera fluorescente. Alternativamente, pueden procesarse los modelos mediante métodos histológicos normales, tales como inmunohistoquímica, usando anticuerpos dirigidos contra una diana celular adecuada, o hibridación *in situ*, para someter a prueba para determinar la expresión de una especie de ARNm particular. Además, esto puede llevarse a cabo de manera automatizada /robótica o semiautomatizada, usando sistemas y software informáticos para obtener imágenes las células en diversos puntos de tiempo y detectar cualquier cambio de, por ejemplo, la densidad, ubicación y/o morfología celular. La microscopía confocal láser de barrido en particular permite el análisis tridimensional de modelos intactos. Por tanto, es posible aplicar directamente al modelo de tejido de pulmón tridimensional, intacto un análisis cuantitativo del comportamiento celular, lo que normalmente sólo es posible para células en cultivo bidimensional convencional.

Mediante estos medios cuantitativos, se obtiene el análisis en serie de la proliferación celular, apoptosis, necrosis, migración e invasión de matriz, entre otras cosas, en un modelo de tejido de pulmón tridimensional que llena el vacío entre los cultivos celulares bidimensionales convencionales y los modelos animales vivos.

Ejemplos experimentales

- 5 La invención se describe adicionalmente en detalle mediante referencia a los siguientes ejemplos experimentales.

Ejemplo 1: Descelularización de pulmón de rata y caracterización morfológica de armazones descelularizados

10 Un órgano descelularizado ofrece varias ventajas para su uso como almacén de creación por ingeniería de tejidos. En un aspecto, el almacén descelularizado contiene la organización tridimensional apropiada requerida para la función del tejido, incluyendo un sistema vascular y red respiratoria en el caso del pulmón. Además, los componentes de la matriz extracelular (ECM) se conservan ampliamente a través de las especies, reduciendo así la probabilidad de que un almacén descelularizado induzca una respuesta inmunitaria tras la implantación xenogénica [Bernard *et al.*, 1983, *Biochemistry* 1983; 22:5213-23]. En otro aspecto, la ECM nativa ofrece el sustrato óptimo para la unión, propagación, crecimiento y diferenciación celulares.

15 El objetivo del procedimiento de descelularización de la presente invención es eliminar material celular y nuclear al tiempo que se conservan aspectos clave de y se minimiza cualquier daño a la ECM del pulmón. Los resultados presentados en el presente documento demuestran que el tejido de pulmón nativo puede descelularizarse para eliminar componentes celulares y moléculas antigénicas, aunque conservando moléculas clave de la matriz extracelular. En un aspecto, un objetivo del procedimiento de descelularización de la invención es generar un almacén de pulmón descelularizado que es completamente compatible con cultivo celular y al mismo tiempo proporcionar una función de barrera. Además, es deseable que el almacén de pulmón descelularizado tenga una red vascular y un árbol respiratorio intactos.

20 Se usó en el presente estudio una metodología química para la descelularización. Los productos químicos usados en este estudio incluían cloruro de sodio, CHAPS y EDTA.

25 Una disolución de cloruro de sodio hipertónica puede lisar eficazmente células, aunque no ayuda a eliminar componentes celulares del tejido. CHAPS es un detergente zwitteriónico, que permite una solubilización eficaz y por tanto la eliminación de material celular. EDTA es un agente quelante que se une a iones divalentes clave (es decir Ca²⁺) que ayuda a alterar la unión celular a la ECM. Además, la disolución es de alta alcalinidad, lo que ayuda a solubilizar componentes celulares citoplasmáticos así como GAG que de lo contrario obstruyen la matriz [Gilbert *et al.*, 2008 *J Surg Res* 152(1): 135-9].

30 Los materiales y métodos empleados en estos experimentos se describen ahora.

Materiales y métodos

Recogida de órganos

35 Se recogieron pulmones de cosecha de órganos de ratas Fischer 344 macho adultos jóvenes (3 meses de edad). Se realizó todo el trabajo experimental con animales con la aprobación del Comité Institucional de Uso y Cuidado de Animales de la Universidad de Yale. Se anestesiaron los animales por medio de inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (Sigma, 40 mg/kg). Tras la inducción de anestesia, se abrió el abdomen por medio de una incisión transversal justo por debajo del margen costal. Se perforó el diafragma, y se cortó la caja torácica para dejar ver los pulmones. Se perfundieron los pulmones por medio del ventrículo derecho con PBS que contenía heparina 50 U/ml (Sigma). Tras completarse la perfusión, se liberaron por disección el corazón, los pulmones y la tráquea y se retiraron en bloque.

Componentes de biorreactor

45 Se obtuvieron los componentes de biorreactor de Cole-Parmer (Vernon Hills, IL). Un tampón de silicona y un tarro de vidrio de 500 ml formaron la base del biorreactor. Se insertaron tubos PharMed (Westlake, OH), tamaños L/S 14 y L/S 16, a través del tapón de silicona para permitir las conexiones necesarias al pulmón, incluyendo un bucle de perfusión y ventilación con aire. Se monitorizó la presión usando un transductor de presión Tru Wave (Edwards Lifesciences, Irvine, CA) entre la bomba de perfusión y la conexión a la arteria pulmonar. Se logró la perfusión usando una bomba de rodillos de velocidad variable Masterflex L/S (Masterflex, Vernon Hills, IL).

Procedimiento de descelularización

50 El fluido usado para la descelularización fue CHAPS 8 mM, NaCl 1 M, EDTA 25 mM en PBS. Se obtuvieron todos los productos químicos de Sigma, y se obtuvo PBS de Gibco. Se llenó el biorreactor con fluido de descelularización, y se transfirió el biorreactor a un incubador mantenido a 37°C. Se monitorizó la presión de perfusión en el flujo de entrada al tronco pulmonar y se mantuvo por debajo de 30 ó 20 mmHg. Se reemplazó el fluido de descelularización por fluido nuevo a los siguientes puntos de tiempo: 30 min, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas. Para la mayoría de las condiciones, se detuvo la descelularización tras 4 ó 6 horas.

Ensayo de ADN

Se cuantificó el contenido en ADN de los tejidos usando el kit de ensayo de ADNbc Quant-iT PicoGreen (Invitrogen, Eugene, OR), siguiendo las instrucciones del fabricante.

5 En resumen, se pesaron muestras de tejido y se liofilizaron, se diluyeron en tampón TE y se mezclaron con el reactivo Quant-iT PicoGreen. Se midió la fluorescencia a 535 nm con excitación a 485 nm, y se cuantificó el contenido en ADN usando una curva patrón. Se midieron al menos 4 muestras para muestras tanto nativas como descelularizadas.

Inmunotransferencia de tipo Western

10 Se digirieron los tejidos para inmunotransferencia de tipo Western en tampón RIPA frío (Boston Bioproducts) con inhibidores de proteasa añadidos (Sigma) y se homogeneizaron a 15.000 rpm durante 30 segundos. Tras la incubación durante 1 hora a 4°C, se eliminaron las partículas insolubles mediante centrifugación a 14.000 g durante 25 min. Se cuantificó la concentración de proteína por medio de ensayo Bradford [Bradford, 1976, Anal Biochem 72:248-54], luego se sometió a ebullición en tampón reductor de Laemmli (Boston Bioproducts) durante 25 min a 65°C. Se almacenaron las muestras a -80°C hasta su análisis. Se ejecutaron las muestras en geles de poliacrilamida de porcentaje variable, usando 25-30 µg de proteína. Tras la electroforesis, se transfirió la proteína a una membrana de nitrocelulosa. Se enjuagaron las membranas en TBS, luego se bloquearon durante 1 hora en leche desnatada en polvo al 5% (NFDM) o albúmina sérica bovina al 3% en TBS con tween-20 al 0,05% (TBS-T). Se aplicaron anticuerpos primarios durante la noche en NFDM al 2% o BSA al 3% en TBS-T. Los anticuerpos secundarios eran de Santa Cruz y se generaron o bien en asno o bien en cabra, y se aplicaron durante 1 hora a temperatura ambiente a una dilución de 1:2000. Se detectó la proteína usando sustrato de Supersignal West Pico, que se aplicó durante 4 minutos antes del revelado de la película.

Inmunofluorescencia

25 Se fijaron bloques de tejido durante 4 horas en formaldehído al 3,7% (Sigma), luego se transfirieron a etanol al 70% y se incrustaron en parafina. Se prepararon secciones finas (5 µm) por la instalación central de histología de la Universidad de Yale. Se desparafinizaron secciones de tejido en xileno, se rehidrataron a través de un gradiente de etanol y se enjuagaron en tampón (PBS + triton-X al 0,2%) durante 15 minutos. Se realizó la recuperación de antígeno en ácido cítrico 0,01 M, pH 6,0, a 70°C durante 20 minutos. Tras enfriar hasta temperatura ambiente, se enjuagaron las secciones en tampón, luego se bloquearon en PBS con albúmina sérica bovina (BSA) al 5% y glicina al 0,75% durante 1 hora a temperatura ambiente. Se aplicaron anticuerpos primarios a las concentraciones apropiadas en tampón de bloqueo durante la noche a 4°C. Se enjuagaron los portaobjetos 3 veces en tampón y luego se aplicaron anticuerpos secundarios a una dilución 1:500 en tampón de bloqueo durante 1 hora a TA. Los anticuerpos secundarios eran anticuerpo de asno anti-cabra o anticuerpo de cabra anti-conejo AlexaFluor 555 y anticuerpo de pollo anti-conejo AlexaFluor 488, obtenidos de Invitrogen. Se montaron los portaobjetos usando medios de montaje que contenían DAPI (Vector Labs), y se adquirieron imágenes usando un microscopio fluorescente invertido Axiovert 200M de Zeiss.

Microscopía electrónica de barrido

40 Se fijaron las muestras usando glutaraldehído al 2% y paraformaldehído al 2,5% en tampón cacodilato 0,1 M (EMD Biosciences, Gibbstown, NJ) durante 2 horas a temperatura ambiente, luego se enjuagaron en tampón cacodilato, se cortaron y se deshidrataron a través de un gradiente de etanol. Se deshidrataron adicionalmente las muestras en hexametildisilazano durante 10 min y se secaron durante la noche, luego se recubrieron por bombardeo catódico con oro y se analizaron usando un instrumento JOEL JXA-8600 en la instalación de Geofísica y Geografía de la Universidad de Yale.

Microscopía electrónica de transmisión

45 Se fijaron las muestras usando paraformaldehído al 4% en PBS y luego se colocaron en glutaraldehído al 2% y paraformaldehído al 2,5% en fijador tamponado con cacodilato de sodio 0,1 M (pH 7,4) durante 2 horas a temperatura ambiente. Se enjuagaron las muestras 3 veces en tampón cacodilato de sodio 0,1 M y se fijaron posteriormente en tetróxido de osmio al 1% durante 1 hora, luego se tiñeron en bloque en acetato de uranilo al 2% en tampón maleato pH 5,2 durante una hora adicional. Entonces, se enjuagaron las muestras, se deshidrataron a través de una serie de etanol graduado y se infiltraron con resina epon y se cocieron durante la noche a 60°C. Se cortaron los bloques endurecidos usando un instrumento UltraCut UCT de Leica y se recogieron secciones de 60 nm sobre rejillas de níquel y se tiñeron usando acetato de uranilo al 2% y citrato de plomo. Se observaron las muestras en un TEM FEI Tecnai Biotwin a 80 kV. Se tomaron imágenes usando una cámara digital CCD Morada usando el software iTEM (Olympus).

Retención de microesferas

55 Se unieron pulmones nativos o descelularizados a cánulas tal como se describe en otra parte en el presente documento, y se infló el pulmón por medio de la tráquea con PBS que contenía microesferas de 5 µm. Entonces se

lavó la vasculatura con 3 enjuagues de 10 ml de PBS. Se lavaron las microesferas dos veces en dH₂O para eliminar los residuos y lisar cualquier célula que de lo contrario afectaría a las lecturas de pulmón nativo. Usando un contador Coulter fijado para medir partículas de entre 4,9 μm y 5,1 μm, se cuantificó la concentración de microesferas en cada muestra y se comparó con una lectura inicial tomada antes de la inyección de microesferas.

5 Obtención de imágenes por micro CT

Se fijaron pulmones nativos o descelularizados en formalina tamponada neutra al 10% (Sigma) y se les inyectó agente de contraste a través de o bien las vías respiratorias o bien la vasculatura. El agente de contraste era bismuto al 20% y gelatina al 5% (Sigma) en PBS. Tras la inyección del contraste, se enfrió el pulmón en un baño de hielo para polimerizar la gelatina.

10 Para el pulmón completo, se obtuvieron imágenes de la vasculatura pulmonar con un sistema de obtención de imágenes de micro-CT (GE eXplore Locus SP, GE Healthcare), fijado a un tamaño de píxel de detector eficaz de 0,029 mm. Se hizo funcionar la micro-CT a un voltaje de tubo de rayos x pico de 60 kV, una corriente del tubo de 80 mA, 1600 milisegundos por fotograma, modelo de agrupamiento de 22 detectores, 720 observaciones y 0,50 incrementos por observación. Para la obtención de imágenes de alta resolución de un lóbulo (lóbulo superior derecho), se situaron las muestras en una platina de rotación controlada por ordenador y se exploró 360° alrededor del eje vertical en etapas de rotación de 0,40°. El tubo se hace funcionar a un pico de 80 kV y 80 mA. El tiempo de exposición para cada observación era normalmente de 3000 milisegundos, con un modelo de agrupamiento de detectores fijado a 1x1 y una resolución de 0,0065 mm. Ambas adquisiciones dieron como resultado un conjunto de imágenes axiales contiguas con formato VFF a través del pulmón o un lóbulo.

20 Con el uso del Software Microview (GE Healthcare), se recogieron los datos sin procesar y se reconstruyeron con vóxeles de dimensiones de 58 μm x 58 μm x 58 μm para visualizar el árbol vascular completo en el pulmón. Para lograr una alta calidad del árbol vascular (un lóbulo), se fijaron los vóxeles de dimensiones a 6,5 μm x 6,5 μm x 6,5 μm. Se usó también este software para reconstruir las imágenes de proyección de intensidad máxima a partir de los datos sin procesar.

25 Técnicas de reformación multiplanar, filtrado espacial y representación de volumen permitieron que el conjunto de datos se observaran en planos transversal, sagital, coronal e híbrido y formato tridimensional. Se usaron imágenes binarias para la extracción de objetos y mediciones de regiones de interés. Se reconstruyen imágenes de volumen tridimensional a partir de las vistas angulares usando un algoritmo de retroproyección filtrada de Feldkamp modificado. Sin embargo, con este sistema, puede estudiarse un pulmón de rata completo (campo de observación, aproximadamente 3,0 cm), con imágenes que tienen dimensiones de vóxel cúbico típicas de tan sólo 58 μm. La opacidad de cada vóxel se representa mediante un valor de escala de grises de 16 bits.

Ahora se describen los resultados de los experimentos.

Método de descelularización

35 Los resultados presentados en el presente documento demuestran un método de descelularización que elimina material celular de lóbulos completos de pulmones de roedor intactos. Se observó que la descelularización usando NaCl 1 M, CHAPS 8 mM y EDTA 25 mM era óptima para eliminar material celular y aún no parecía eliminar colágeno o fibras de elastina (basándose en la histología) o dañar la integridad estructural de la matriz (basándose en pruebas mecánicas). En comparación, se encontró que la descelularización con disoluciones que contenían SDS dañaba la resistencia mecánica de la matriz. Se encontró que otras condiciones o bien no eliminaban eficazmente el material celular o bien provocaban disminuciones significativas en la integridad de la matriz.

Análisis histológico

45 Se usó histología para caracterizar muchos armazones de pulmón descelularizados. Basándose en la tinción con H&E y la tinción con DAPI para núcleos y ADN, los pulmones descelularizados no mostraban una sola célula intacta. En ocasiones, se observaba ADN desenrollado o antígeno celular, pero no se observaban células intactas. La figura 1 demuestra la tinción con H&E de pulmón nativo y descelularizado, mientras que la figura 2 muestra la tinción con DAPI del ADN remanente. También se observó la conservación de la estructura pulmonar basándose en el hecho de que los tabiques alveolares parecían intactos en secciones histológicas convencionales, al igual que en vasos sanguíneos y vías respiratorias más grandes.

Contenido en ADN

50 La eliminación completa de material celular es importante por varios motivos. En primer lugar, si el armazón está destinado a usarse para aplicaciones de ingeniería de tejidos, debe estarse seguro de que todas las células del armazón se eliminen antes de sembrar el armazón con una nueva fuente de células. Además de complicar la evaluación de los armazones resembrados, cualquier material celular restante provocaría complicaciones inmunitarias si el tejido creado por ingeniería se usa para aplicaciones *in vivo* [Conconi *et al.*, 2005, *Transpl Int* 18:27-34; Macchiarini *et al.*, 2008, *Lancet* 372(9655):2023-30; Alexander *et al.*, 2009, *Cell Transplant* 18:255-9].
55 Como resultado, se ha confirmado que en el armazón de la presente invención no están presentes antígenos de

tanto CMH de clase I como de clase II en los armazones descelularizados. En segundo lugar, con el fin de evaluar por separado las contribuciones de la matriz extracelular a la mecánica del pulmón, todos los componentes celulares deben eliminarse. Las dos clases de componentes que pueden contribuir a la mecánica periférica del pulmón son el material celular y la matriz extracelular. La matriz extracelular puede dividirse además principalmente en colágeno, elastina y proteoglicanos [Cavalcante *et al.*, 2005, J Appl Physiol 98:672-9; Dunsmore *et al.*, 1996, Am J Physiol 270:L3-27; Ito *et al.*, 2005, J Appl Physiol 98:503-11; Suki *et al.*, 2005, J Appl Physiol 98: 1892-9]. Al garantizar la eliminación de los componentes celulares de los armazones descelularizados, pueden evaluarse las propiedades mecánicas del armazón.

Con el fin de documentar la eliminación de material celular, se realizó un ensayo de ADN cuantitativo. Se observó una reducción drástica en el contenido en ADN en armazones descelularizados en comparación con pulmón nativo (figura 1C). Los armazones descelularizados contenían aproximadamente el 1,2% del ADN encontrado en pulmón nativo, lo que correspondía a $1,83 \pm 0,29$ ng de ADN por mg de peso seco. Esto es en comparación con $38,7 \pm 5,8$ ng/mg para pulmón nativo. Aunque puede usarse generalmente un enjuagado extenso de los armazones para minimizar el ADN remanente, era difícil la eliminación completa de todo el ADN y quedaban pequeñas cantidades de ADN, tal como se demostraba mediante tinciones con DAPI que mostraban pequeñas agrupaciones de ADN desenrollado en la figura 2. La reducción drástica en el contenido en ADN era indicativa de eliminación celular, y junto con los hallazgos histológicos confirmó que todo el material celular viable estaba ausente de los armazones.

En los armazones descelularizados, se ha demostrado que casi el 99% del ADN se ha eliminado. Queda una pequeña cantidad de ADN en la matriz, pero está presente como hebras de ADN alargadas, tal como se muestra en la figura 2. Se ha observado que no hay organización de este ADN remanente en estructuras nucleares, basándose en la tinción con DAPI.

Se ha observado la eliminación del 98,8% del ADN en comparación con pulmón nativo, con una concentración de ADN remanente de 1,83 ng de ADN por mg de tejido (peso seco). Esto se compara favorablemente con los niveles de 16,6 ng/mg de ADN remanente observado por otros para tejido de corazón descelularizado [Ott *et al.*, 2008, Nat Med 14:213-21], considerando especialmente que el nivel está normalizado para peso húmedo, no peso seco como en este y otros estudios [Gilbert *et al.*, 2008 J Surg Res 152(1): 135-9]. Sin embargo, los niveles de ADN remanente observados son superiores a los observados para armazones de ECM producidos en laboratorio y disponibles comercialmente usados para injertos de piel, en donde la mayoría de los armazones muestran menos de 0,2 ng de ADN por mg de peso seco, aunque algunos armazones tenían tanto como 1. 13 ng/mg de ADN remanente [Gilbert *et al.*, 2008 J Surg Res 152(1): 135-9].

Inmunogenicidad

Se caracterizó la inmunogenicidad de los armazones descelularizados mediante tinción para antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I y II. Las proteínas de CMH de clase I y II son glicoproteínas de membrana que son importantes en el campo de la respuesta inmunitaria específica de antígeno. El antígeno de CMH de clase I se expresa en todas las células nucleadas, mientras que el antígeno de CMH de clase II se encuentra en células especializadas del sistema inmunitario. Los antígenos de CMH de clase I permiten a un organismo reconocer "lo propio" de lo "no propio", y por tanto es importante que se eliminen del armazón descelularizado con el fin de evitar problemas inmunitarios tras la implantación futura de tejido de pulmón creado por ingeniería en un modelo animal. La figura 3 representa los resultados de inmunotransferencia de tipo Western para antígeno de CMH de clase I y II así como actina β . Se observó la pérdida completa de antígenos de tanto CMH de clase I como de clase II mediante inmunotransferencia, confirmando que no se esperaba que los armazones descelularizados provocasen una respuesta inmunitaria significativa si se usan para aplicaciones de ingeniería de tejidos. También se perdió la actina β , lo que concuerda con la ausencia de material celular. Se cree que no es probable que los armazones provoquen una respuesta inmunitaria si se implantan en un huésped.

Caracterización de la matriz extracelular

Colágeno: El colágeno es el componente estructural más importante del pulmón, siendo principalmente responsable de la fuerza mecánica global del tejido. Se usó inmunofluorescencia para caracterizar la distribución de colágenos I y IV en pulmón nativo y descelularizado, tal como se muestra en la figura 4. Tanto el colágeno I como el IV se retienen en la matriz descelularizada, observándose el colágeno I principalmente alrededor de la vasculatura y las vías respiratorias grandes, y observándose el colágeno IV por todo el parénquima. Se observaron patrones de tinción similares para tanto pulmón nativo como descelularizado. La conservación de estos subtipos de colágeno en sus ubicaciones anatómicamente apropiadas puede permitir la deposición selectiva de tipos de células durante el desarrollo de tejido de pulmón creado por ingeniería.

Evaluación por EM de barrido de armazones descelularizados

Se usó microscopía electrónica de barrido (SEM) para evaluar la microestructura de los armazones de pulmón descelularizados. La figura 5 muestra imágenes de muestra, que demuestran la eliminación celular aunque el mantenimiento global de la arquitectura alveolar. Los alveolos en pulmones descelularizados parecen ligeramente

desinflados, lo que es un artefacto de fijación. Se fijó el pulmón nativo inflando el pulmón con fijador; sin embargo, el pulmón descelularizado no puede contener el fluido fijador dentro del compartimento alveolar cuando se presuriza, dando por tanto al pulmón un aspecto desinflado. Sin embargo, hay una similitud general en la arquitectura alveolar con la conservación de los tabiques alveolares. Estos resultados, junto con hallazgos de estudios de histología, indican que la estructura alveolar y la arquitectura de las vías respiratorias pulmonar global, incluyendo los tabiques alveolares, estaban intactas en los armazones descelularizados.

Impacto de la presión de perfusión sobre la ultraestructura del armazón

Además de los estudios de EM de barrido, se usó EM de transmisión (TEM) para estudiar la membrana basal capilar-alveolar. Ésta es una característica crítica de los armazones descelularizados ya que la presencia de una red capilar intacta permite al armazón descelularizado resistir el tránsito macromolecular a los espacios alveolares y también proporciona un sustrato adecuado para el crecimiento de endotelio capilar en tejidos de pulmones creados por ingeniería.

Las figuras 7A y 7B representan imágenes de TEM de pulmón nativo y pulmón que se descelularizó sin control de las presiones de perfusión vascular. En tales condiciones, la membrana basal alveolar no podía a veces identificarse y no podían encontrarse capilares. Sin querer restringirse a ninguna teoría particular, se cree que el daño a la membrana basal y a la ultraestructura podría reducirse minimizando las presiones de perfusión durante el procedimiento de descelularización y vasodilatando de manera máxima la vasculatura antes de comenzar la descelularización. Aunque el fluido de descelularización se perfundió a través de la vasculatura a velocidades de flujo subfisiológicas, la presión de perfusión vascular puede volverse suprafisiológica durante la descelularización debido a lisis celular masiva y acumulación de proteína celular y ADN en la vasculatura. Por tanto, se monitorizó cuidadosamente la presión de la arteria pulmonar y se modificó el biorreactor de descelularización y la velocidad de perfusión con el fin de mantener esta presión estrictamente por debajo de ~20-30 mmHg. Se utilizó el vasodilatador nitroprusiato de sodio para minimizar las presiones de perfusión iniciales.

La figura 6C muestra imágenes de TEM de armazones descelularizados con presiones mantenidas por debajo de ~30 mmHg. En estas condiciones, se observó una membrana basal alveolar continua, intacta. Se retienen fibras de colágeno y otros componentes de la matriz dentro de los tabiques alveolares. Sin embargo, no se observa la presencia de estructuras capilares claras, que deben estar presentes en abundancia rodeando a los alveolos.

Retención de estructuras capilares en armazones descelularizados

La presión típica en el sistema vascular pulmonar del roedor es menor de 15 mmHg [Lee *et al.*, 1999, Cell 99:301-12], significativamente inferior a los 30 mmHg utilizados en los estudios anteriores. A pesar de reducir la velocidad de flujo de la perfusión y usar un vasodilatador para disminuir las presiones de perfusión, era difícil mantener la presión de perfusión de descelularización por debajo de 30 mmHg. Sin embargo, se descubrió que una ligera modificación en el protocolo de descelularización permitía la perfusión durante la descelularización a presiones menores de ~20 mmHg. De manera significativa, esto permitía la retención de estructuras capilares. Esta modificación abarcaba el lavado del compartimento de las vías respiratorias con fluido de descelularización antes de comenzar la perfusión del fluido de descelularización a través de la vasculatura. El resultado fue la disminución significativa de la presión de perfusión vascular, especialmente al comienzo del procedimiento de descelularización. Tal como se muestra en la figura 8, esta técnica permitió la retención de estructuras capilares en los armazones descelularizados. Se cree que la retención de capilares es un desarrollo significativo en la creación de armazones de pulmón descelularizados.

El armazón debe retener una red vascular y un árbol respiratorio intactos. Usando microscopía electrónica de transmisión y barrido además de obtención de imágenes de micro-CT, se ha demostrado que, globalmente, el armazón está notablemente bien conservado tras el procedimiento de descelularización. La EM de barrido, así como la histología de rutina, demostró que el armazón estaba en su mayor parte intacto sin defectos grandes (es decir, los alveolos y tabiques alveolares parecen intactos). La EM de transmisión demostró que la membrana basal alveolar estaba bien conservada y que al menos se retenían algunos capilares. La obtención de imágenes de micro-CT demostró que la vasculatura estaba intacta hasta vasos de 100 µm de diámetro.

Evaluación de la permeabilidad

Con el fin de que un pulmón funcione *in vivo*, debe presentar una vasculatura continua, patente y sin fugas con el fin de evitar una pérdida masiva de sangre a los espacios alveolar e intersticiales. Se evaluó la capacidad de los armazones de pulmón descelularizados de retener microesferas de 5 µm en el compartimento de las vías respiratorias, sin permitir el transporte de estas macromoléculas a la vasculatura. Se usaron partículas de cinco µm con el fin de imitar el tamaño de los glóbulos rojos, el principal componente de la sangre, que se necesitaría que se retuviesen en la vasculatura. Por tanto, se evaluó la fuga de partículas de 5 µm fuera de las vías respiratorias y dentro de la vasculatura, con la suposición de que no había direccionalidad significativa en el movimiento de tales partículas a través de una membrana descelularizada.

Se determinó la permeabilidad de pulmones nativos, pulmones descelularizados con presiones de perfusión no

controladas (velocidad de flujo de perfusión constante) y pulmones descelularizados tras la vasodilatación y con presiones de perfusión controladas (menos de 30 mmHg). Los resultados se muestran en la figura 8, y confirmaron los hallazgos de TEM a una mayor escala. Se observó que la descelularización con presión de perfusión alta (no controlada) conducía a un 39% de fuga, en comparación con el 5,7% para una baja presión descelularización y del 2,1% para pulmón nativo.

Obtención de imágenes de micro-CT

Se usó la obtención de imágenes de micro-CT para evaluar la permeabilidad de las vías respiratorias y los compartimentos vasculares de armazones de pulmón descelularizados. Esta técnica permite obtener imágenes tridimensionales de los armazones de pulmón, y facilita la identificación del grado de permeabilidad de los compartimentos de las vías respiratorias y vasculares.

La figura 9 muestra imágenes de la vasculatura, con una resolución de 58 μm . A esta resolución, se muestra que los vasos grandes están intactos (paneles superiores de la figura 9), y las muestras nativas y descelularizadas son generalmente similares, mostrado en los paneles inferiores y del medio. En la figura 10 se muestran imágenes de resolución superior (6,8 μm) de la vasculatura, en donde los vasos se muestran como proyecciones tridimensionales (proyecciones de intensidad máxima). En estas imágenes, se identificó una ligera fuga vascular como la nebulosidad mostrada en algunas zonas del armazón descelularizado.

Una característica crítica de la matriz descelularizada es la conservación de la estructura tridimensional nativa. Con el fin de evaluar el grado en el que se conservó la estructura de los armazones descelularizados, se usó una combinación de EM de barrido y transmisión, micro-CT y un ensayo de permeabilidad de microesferas. Se examinaron las características ultraestructurales de pulmón descelularizado usando SEM, y se demostró el mantenimiento de la arquitectura alveolar y los tabiques alveolares. La EM de transmisión demostró una membrana basal alveolar completamente intacta así como fibras de colágeno y elastina. Estos hallazgos de EM concuerdan con otro trabajo en descelularización de matriz de pulmón, en donde se retienen tales estructuras [Lwebuga-Mukasa *et al.*, 1986, Exp Cell Res 162:423-35]. Con un control estricto de la presión de perfusión vascular durante la descelularización, los resultados presentados en el presente documento demuestran la retención de capilares. La obtención de imágenes de micro-CT demostró la retención de la red vascular hasta vasos de 100 μm de diámetro, basándose en estimaciones conservadoras, con un número sustancial de vasos más pequeños también intactos.

Ejemplo 2: Contribución de componentes de la matriz extracelular a la integridad mecánica de tejido de pulmón descelularizado

Los siguientes experimentos se diseñaron para evaluar la composición de los armazones descelularizados en más detalle con un foco en las propiedades mecánicas de los armazones. Sin querer restringirse a ninguna teoría particular, se cree que los armazones de pulmón descelularizados retienen características mecánicas notables del pulmón nativo, debido principalmente a las contribuciones del colágeno y la elastina. Los resultados presentados en el presente documento demuestran la utilidad del tejido de pulmón descelularizado como plataforma para estudiar la mecánica del pulmón independientemente de las contribuciones celulares.

Los resultados presentados en el presente documento demuestran que el contenido en colágeno se retiene, el contenido en elastina se retiene a ~40% de los niveles nativos, mientras que los glucosaminoglucanos se pierden en gran medida de los armazones descelularizados.

Los materiales y métodos empleados en estos experimentos se describen ahora.

Materiales y métodos

Recogida de órganos y descelularización

Se recogió tejido de pulmón y se descelularizó tal como se describió en otra parte en el presente documento.

Análisis histológico

Se usó histología para caracterizar muchos armazones de pulmón descelularizados, y para confirmar la eliminación de material celular. Se fijaron los tejidos, se incrustaron en parafina y se cortaron. Se realizó el análisis con tinción con hematoxilina y eosina (H&E) convencional, tricrómica de Masson para colágeno, Verhoeff van Gieson para elastina y azul alcian para proteoglicanos, así como tinción para ADN usando 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI).

Ensayo de colágeno

Se cuantificó el colágeno con un ensayo colorimétrico para detectar OH-prolina usando un método de Grants modificado [Grant, 1964, 1964, J Clin Pathol 17:685-6]. Se liofilizaron muestras de pulmón y se pesaron, entonces se incubaron en papaína (140 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a 60°C durante la noche (Sigma). Se incubaron las muestras digeridas con papaína en HCl 6 N a 115°C durante 18 horas, se neutralizaron, se oxidaron con cloramina-T y se hicieron reaccionar con p-dimetilaminobenzaldehído. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 550 nm y se usó

una razón 1:10 p/p de hidroxiprolina con respecto a colágeno para calcular el contenido en colágeno del tejido. Se midieron al menos 4 muestras para muestras nativas y descelularizadas.

Ensayo de elastina

5 Se cuantificó la elastina usando el kit de ensayo de elastina Fastin (Biocolor, Belfast, Irlanda del Norte). En primer lugar se liofilizaron muestras de pulmón y se pesaron, y entonces se extrajo la elastina siguiendo el método descrito en Foronjy *et al.* [Foronjy *et al.*, 2008, Am J Physiol Lung cell Mol Physiol 294:L1149-57]. Se incubaron las muestras con ácido oxálico 0,25 M a 100°C; luego se centrifugaron a 10.000 g y se guardó el sobrenadante. Se agrupó el sobrenadante de las extracciones, y también se midió el sobrenadante de la 6ª extracción para garantizar que no quedaba más elastina en el tejido. Se clarificó el ácido oxálico usando un filtro de punto de corte de peso molecular de 10.000 (Millipore), luego se resuspendió en dH₂O y se analizó usando el kit de elastina Fastin según las instrucciones del fabricante. Se midieron al menos 4 muestras para muestras nativas y descelularizadas.

Ensayo de glucosaminoglucano sulfatado

15 Se cuantificaron los glucosaminoglucanos sulfatados (sGAG), incluyendo sulfatos de condroitina, dermatano, heparano y queratano, usando el kit de ensayo de GAG Blyscan. Se sometieron a ensayo muestras digeridas con papaína (preparadas tal como se describe para el ensayo de colágeno, anteriormente) según las instrucciones del fabricante. En resumen, se marcaron GAG sulfatados con colorante de azul de 1,9-dimetil-metileno y se midió la absorbancia a 650 nm.

Pruebas mecánicas

20 Se analizaron muestras de pulmón nativo y descelularizado usando un instrumento Instron 5848 equipado con una célula de carga de 10 N. Se preestiraron cíclicamente cortes de tejido de dimensiones conocidas durante 10 ciclos hasta el 20% de deformación para investigar las propiedades elásticas y luego se estiraron hasta el fallo para evaluar la resistencia a la rotura por tracción (UTS). Véase la figura 11 para un esquema del protocolo de pruebas. Usando las dimensiones tisulares, se calcularon la tensión de ingeniería y deformación de ingeniería a partir de la fuerza y la distancia.

25 Los resultados de los experimentos se describen ahora.

Contenido en colágeno y elastina

30 Tal como se muestra en la figura 12C, el contenido en colágeno en armazones descelularizados no podía distinguirse de pulmón nativo. Esta conservación de colágeno es importante ya que el colágeno desempeña un papel clave en la resistencia mecánica del pulmón. El contenido en colágeno también se mantuvo en la tinción histoquímica por medio de tricrómica de Masson, mostrado en la figura 12. También mostrado en la figura 12C, el contenido en colágeno disminuyó en armazones descelularizados con SDS, uno de los métodos de descelularización que se encontró que no era adecuado. Se cree que esta pérdida de colágeno se correlaciona con la disminución de la integridad mecánica en armazones descelularizados con SDS.

35 El contenido en elastina también se conservó, aunque disminuido, en los armazones descelularizados, tal como se demostró mediante tanto ensayo cuantitativo como tinción histológica (figura 13). Las fibras de elastina permiten la elasticidad del pulmón, crítica para el retroceso natural del tejido que desempeña un papel clave en la relajación y por tanto exhalación del pulmón tras la inhalación. La retención de estas fibras a través del procedimiento de descelularización es crítica, ya que permite que el armazón de pulmón se ventile apropiadamente durante los esfuerzos en la resiembra del armazón con poblaciones de células pulmonares. Aunque los armazones pierden el 40 60% del contenido en elastina nativa, la elastina restante era suficiente para permitir la función elástica de los pulmones, tal como se observa a partir de los resultados de las pruebas mecánicas comentados en otra parte en el presente documento.

45 Globalmente, la retención de estos componentes clave de la ECM permitió que el armazón experimentase niveles fisiológicos de tensión mecánica, lo que es importante ya que una variedad de procesos de diferenciación celular y del desarrollo se basan en estímulos mecánicos. Además, la ECM es crítica en ayudar a la unión celular a la matriz, y la retención de estos componentes nativos de la ECM facilita la unión y propagación celulares y por tanto el desarrollo de tejidos de pulmón creados por bioingeniería.

Contenido en proteoglicano

50 Los proteoglicanos consisten en una proteína central unida a una o más cadenas de glucosaminoglucano (GAG). La mayoría de los GAG están sulfatados, lo que permite su detección por medio de ensayo cuantitativo, cuyos resultados se muestran en la figura 14. Se observó que el contenido en GAG de los armazones descelularizados era significativamente inferior al del pulmón nativo (~6% de los niveles de pulmón nativo). Se encuentran proteoglicanos o bien en la superficie de la célula o bien dentro de la matriz extracelular [Ferdous *et al.*, 2007, Tissue Engineering 13:1893-904], y su eliminación se debe en parte a la eliminación de GAG unidos a células. Sin embargo, los GAG encontrados dentro de la ECM también pueden solubilizarse por medio de las disoluciones de descelularización. La 55

figura 14, es una tinción histológica con azul alcian para detectar proteoglicanos, que muestra que la cantidad de GAG que quedan en los armazones de pulmón descelularizados estaba disminuida en comparación con pulmón nativo, confirmando los resultados del ensayo cuantitativo.

Caracterización mecánica

5 Se usaron pruebas mecánicas de tiras de pulmón periférico para evaluar la mecánica cuasiestática de muestras de tanto pulmón nativo como descelularizado. Las regiones elásticas de las curvas de tensión-deformación indican que muestras tanto nativas como descelularizadas demostraban un comportamiento histerético. La histéresis demuestra que el pulmón es un material viscoelástico, y la diferencia entre las curvas de expansión y relajación representa energía que no se recupera durante la relajación. Además, las muestras no presentaban fluencia, tal como se muestra en la figura 15. Si el tejido de pulmón presentara fluencia, no se desinflaría hasta su posición original tras inflarse; por tanto, el pulmón nunca se desinflaría completamente y el intercambio gaseoso se vería alterado. Esta conservación del comportamiento elástico apropiado es importante para un almacén de pulmón porque se observa pérdida de la elasticidad pulmonar en varios estados patológicos, notablemente enfisema [Gelb *et al.*, 2002, Chest 121:715-21].

15 La resistencia a la rotura por tracción (UTS) es la tensión sobre una muestra en el fallo, y es una medida de la resistencia de un material. Tal como se demuestra en la figura 16, la UTS de muestras descelularizadas no podía distinguirse de la de muestras nativas. Sin embargo, si las muestras se descelularizaban en tampones que contenían dodecilsulfato de sodio (SDS), la integridad mecánica se veía comprometida tal como se demostró por la disminución en la UTS. El SDS puede degradar el colágeno, provocando la fragmentación y el hinchamiento de tejidos [Bodnar *et al.*, 1986, Thorac Cardiovasc Surg. 34(2):82-5; Gilbert *et al.*, 2006, Biomaterials 27:3675-83] y también se ha mostrado que aumenta la extensibilidad tisular [Mirsadraee *et al.*, 2006, Tissue Eng 12:763-73]. El SDS es un detergente anfipático, altamente iónico, y su región hidrófoba puede interactuar con proteínas al tiempo que la porción hidrófila, especialmente cuando está cargada negativamente, se une al agua y provoca hinchazón del tejido [Bodnar *et al.*, 1986, Thorac Cardiovasc Surg.34(2):82-5]. Aunque otros estudios no siempre han observado una disminución en la UTS con el tratamiento con SDS [Mirsadraee *et al.*, 2006, Tissue Eng 12:763-73], esto puede deberse a diferencias en el tejido. Mirsadraee *et al.* estudiaron el tejido pericárdico, que contiene fibras de colágeno empaquetadas mucho más densamente que el pulmón. En el pulmón, debido a la geometría del tejido, las fibras de colágeno están altamente distribuidas, y la hinchazón inducida por SDS puede conducir mucho más fácilmente a eliminación del colágeno, tal como se observa en el ensayo de colágeno cuantitativo.

30 Los resultados presentados en el presente documento demuestran que los armazones descelularizados pueden aguantar fuerzas fisiológicas relevantes *in vivo*.

Los resultados presentados en el presente documento confirmaron que tanto el colágeno como la elastina se conservaban a niveles funcionales. Estos hallazgos confirmaron que los principales contribuidores a la mecánica del pulmón son el colágeno y la elastina, y no constituyentes celulares o proteoglicanos. Los resultados presentados en el presente documento demuestran la producción de armazones de pulmón descelularizados que presentan características de pulmón nativo, lo que les hace sustratos prometedores para aplicaciones de ingeniería de tejidos así como una plataforma para el estudio de la mecánica detallada de la matriz y la biología, el desarrollo y la fisiología del pulmón.

Ejemplo 3: Diseño y validación de un biorreactor para el cultivo *in vitro* de tejidos de pulmón tridimensionales

40 Puede usarse un biorreactor para cultivar tejido de pulmón tridimensional *in vitro*. El desarrollo de un biorreactor de este tipo sería beneficioso no sólo para investigar el crecimiento de tejido de pulmón creado por ingeniería, sino para estudiar la biología pulmonar. Actualmente no hay ningún sistema disponible que permite el cultivo *in vitro* a largo plazo de tejido de pulmón adulto.

45 Se realizaron los siguientes experimentos para el diseño de un biorreactor para el cultivo *in vitro* de tejido de pulmón completo. Se diseñó el biorreactor para cumplir una serie de restricciones de diseño dirigidas a la capacidad para proporcionar un suministro de nutrientes suficiente y una estimulación mecánica al tejido de pulmón con el fin de soportar la supervivencia y la diferenciación celulares. Se diseñaron experimentos para evaluar si el biorreactor podía soportar el cultivo *in vitro* de lóbulos completos de tejido de pulmón, que se demuestra por el mantenimiento de la viabilidad celular y el estado de diferenciación. En el proceso de evaluar el biorreactor, se evaluaron los efectos de la perfusión y ventilación sobre la supervivencia del pulmón en el biorreactor. Los resultados presentados en el presente documento demuestran que el biorreactor puede usarse para el cultivo de tejido de pulmón *in vitro* y por tanto puede aplicarse para crear por ingeniería tejido de pulmón.

Se describen ahora los materiales y métodos empleados en estos experimentos.

Materiales y métodos

55 Cultivo de pulmón completo

Se recogieron pulmones de ratas Fischer 344 macho adultas jóvenes (3 meses de edad). Se realizó todo el trabajo

experimental con animales con la aprobación del Comité Institucional de Uso y Cuidado de Animales de la Universidad de Yale. Se anestesiaron los animales por medio de inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (Sigma, 40 mg/kg). Tras la inducción de anestesia, se pulverizó el pecho y abdomen con etanol y se hizo una incisión transversal justo por debajo del margen costal, abriendo la cavidad abdominal. Se perforó el diafragma, y se

5 retrajeron las costillas, teniendo cuidado de no tocar los pulmones. Se cortó la vena cava inferior y se perfundieron los pulmones por medio del ventrículo derecho con 20-30 ml de PBS que contenía heparina 50 U/ml (Sigma) y nitroprusiato de sodio 1 µg/ml (Sigma). Entonces se diseccionó la tráquea y se cortó tan alta como fuera posible. Se liberaron por disección todas las conexiones restantes al corazón y los pulmones, permitiendo la eliminación del corazón, los pulmones y la tráquea en bloque del animal.

10 Unión de las cánulas

Tras la retirada de los órganos, se conectaron cánulas a la tráquea y al tronco de la arteria pulmonar por medio del lado derecho del corazón. Se cortó el vértice del corazón con un bisturí, y se insertó una cánula en ángulo recto a través del ventrículo derecho y dentro del tronco pulmonar. Se unió una jeringa a esta cánula y se inyectaron 5-10 ml de solución salina heparinizada para garantizar una colocación apropiada de la cánula y una perfusión adecuada de

15 los pulmones sin fugas. Entonces se sujetó esta cánula con sutura al corazón. Se insertó una cánula recta independiente, con extremo en lengüeta dentro de la tráquea y se sujetó con sutura. Entonces se conectaron los pulmones al biorreactor, y se descelularizaron siguiendo el protocolo descrito en otra parte en el presente documento.

Se unieron las cánulas a la arteria pulmonar por medio del ventrículo derecho y a la tráquea, y se conectó el pulmón al biorreactor. Se lavaron las vías respiratorias con anfotericina al 2%, penicilina y estreptomycin en PBS, seguido por dos lavados con PBS, y entonces se llenó el biorreactor con medio y comenzó el cultivo. Se realizaron la perfusión y ventilación vasculares tal como se dicta por las condiciones experimentales.

20

Componentes de biorreactor

Se obtuvieron los componentes de biorreactor de Cole-Parmer (Vernon Hills, IL) a menos que se indique otra cosa. Un tampón de silicona y un tarro de vidrio de 500 ml formaron la base del biorreactor. Se insertaron tubos PharMed (Westlake, OH), tamaños L/S 14 y L/S 16, a través del tapón de silicona para permitir las conexiones necesarias al pulmón, incluyendo un bucle de perfusión, conexión traqueal, ventilación con aire y orificios de intercambio de medio. Se monitorizó la presión usando un transductor de presión TruWave (Edwards Lifesciences, Irvine, CA) entre la bomba de perfusión y la conexión a la arteria pulmonar. Se logró la perfusión usando una bomba de rodillos de

25 velocidad variable Masterflex L/S (Masterflex, Vernon Hills, IL). Se realizó la ventilación usando una bomba de jeringa programable de múltiples canales (Cole Parmer), con inhalación y exhalación realizadas cada una a lo largo de 30 segundos usando un volumen de 10 ml. En la figura 17 se muestra un diagrama del biorreactor.

30

Histología e inmunofluorescencia

Tras el periodo de cultivo deseado, se fijaron los pulmones, se incrustaron en parafina y se cortaron. Se realizó histología de rutina (H&E), así como inmunofluorescencia para acuaporina-5 (epitelio de tipo I), proteína C tensoactiva (epitelio de tipo II), CCSP (células Clara) y PECAM-1 (endotelio). Se desparafinizaron las secciones en xileno, se rehidrataron y se incubaron con PBS con triton-X (tampón) al 0,2% durante 15 minutos. Se realizó la recuperación de antígeno usando ácido cítrico 0,02 M en PBS durante 20 min a 75-85° C, tras lo cual se enjuagaron las secciones en tampón. Se realizó el bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente con PBS + albúmina sérica bovina al 1% y glicina al 0,75%. Se eliminaron los anticuerpos primarios mediante enjuague con tampón y se aplicó el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente a una dilución 1:500. Los anticuerpos secundarios se obtuvieron de Invitrogen (AlexaFluor 555 o AlexaFluor 488x). Se adquirieron imágenes con un microscopio fluorescencia invertido Axiovert 200M de Zeiss.

35

Se evaluó la proliferación celular por medio de tinción para antígeno nuclear celular en proliferación (PCNA) (Zymed, San Francisco, CA), y se detectaron núcleos apoptóticos con tinción de marcaje de extremos mellados con dUTP mediada por desoxinucleotidil transferasa terminal (TUNEL) (Calbiochem, San Diego, CA). Se siguieron las instrucciones del fabricante para ambos ensayos.

45

Ensayo de ventilación de microesferas

Con el fin de determinar si la ventilación de los pulmones en el biorreactor era suficiente para inducir movimiento de medio para perfundir la vasculatura, se desarrolló un ensayo sencillo usando microesferas de poliestireno de 5 µm (SPI Supplies, West Chester PA). Se conectaron los pulmones al biorreactor, tal como se describe en otra parte en el presente documento, y se ventilaron pero no se perfundieron. Se llenó la cámara del biorreactor con 100 ml de medio que contenía 10 millones de microesferas (0,1 millones de microesferas por ml de medio). Se permitió que avanzara el cultivo, con ventilación sólo, durante 3 h. Entonces se fijó el pulmón, se incrustó en parafina, se cortó y se analizó histología de rutina (H&E).

50

55

Ahora se describen los resultados de los experimentos.

Requisitos de diseño del biorreactor

El biorreactor incorpora características clave del entorno *in vivo* del roedor pero también se diseñó para permitir al usuario modificar varios parámetros clave dependiendo de las condiciones deseadas. Los objetivos del diseño son los siguientes:

- 5 • El sistema debe poder perfundir medio a través de la vasculatura a una velocidad especificada por el usuario y dentro de los niveles fisiológicos.
- El sistema debe poder ventilar los pulmones con aire o medio a través de la tráquea. Es preferible una ventilación a presión negativa y la capacidad de ventilar de manera constante los pulmones, con el fin de ser consecuente con las condiciones fisiológicas normales.
- 10 • El biorreactor debe permitir preferiblemente que diferentes tipos de medios bañen los compartimentos vascular y de las vías respiratorias del pulmón.
- El biorreactor debe permitir el intercambio de gases dentro del medio de cultivo, al tiempo que simultáneamente se cumplen los requisitos anteriores para la ventilación.
- 15 • El biorreactor debe tener orificios para permitir mediciones de la presión de la arteria pulmonar y las presiones traqueales. Las presiones deben estar idealmente dentro de los valores fisiológicos normales, con una presión en la arteria pulmonar de menos de 15-30 mmHg [Li *et al.*, 2004, Proc Natl Acad Sci USA 101:11488-93].
- El biorreactor debe tener un medio para permitir el intercambio de medio en una base periódica.
- El biorreactor debe ser pequeño y estar autocontenido de manera que pueda ajustarse dentro de los confines físicos de un incubador de cultivo de tejido convencional.
- 20 • Todos los componentes del biorreactor deben ser económicos y estar fácilmente disponibles.
- El biorreactor y todos los componentes deben poder esterilizarse, preferiblemente por medio de autoclave.

Se diseñó un biorreactor y se construyó cumpliendo los criterios anteriores. En la figura 17 se muestra un esquema del biorreactor.

Sistema de perfusión del biorreactor

- 25 Se proporcionó perfusión al pulmón por medio de una bomba de rodillos que hace circular medio desde el biorreactor principal al interior de la arteria pulmonar. La velocidad de perfusión puede especificarse por el usuario. El corazón de la rata se mantiene unido al pulmón con el fin de facilitar la conexión de una cánula al tronco de la arteria pulmonar a través del ventrículo derecho del corazón. Sin embargo, la vena pulmonar no se conectó directamente al bucle de perfusión. Más bien, se drenaron las venas pulmonares a través del lado izquierdo del corazón directamente al depósito de biorreactor principal. El drenaje venoso del pulmón existe directamente dentro del biorreactor principal.
- 30

La velocidad de perfusión a través de los pulmones puede fijarse a unas especificaciones del usuario. Las velocidades de flujo fisiológicas en la rata adulta son de 40-80 ml/min, aunque para cultivo de tejido creado por ingeniería la velocidad de flujo es normalmente mucho menor que este valor. En una rata adulta, todo el volumen de sangre debe pasar a través de los pulmones con el fin de oxigenarse, mientras que durante el cultivo de tejido creado por ingeniería, sólo debe perfundirse suficiente medio para soportar el crecimiento de las células pulmonares. Por tanto, las velocidades de perfusión durante cultivo creado por ingeniería son más cercanas a las de una rata fetal, mientras que el flujo de sangre al pulmón es de sólo el 8-10% del gasto cardíaco debido a una derivación fisiológica normal [Hislop *et al.*, 2000, Ped Resp Rev 1:321-7]. El perfil de presión puede controlarse a un grado limitado usando vasodilatadores tales como nitroprusiato de sodio, que puede usarse para reducir la presión vascular pulmonar. Normalmente la presión de perfusión se mantiene por debajo de \square 30 mmHg, el valor máximo observado normalmente en el sistema arterial pulmonar [Li *et al.*, 2004, Proc Natl Acad Sci USA 101: 11488-93].

Sistema de ventilación del biorreactor

45 El biorreactor podía realizar ventilación tanto positiva como negativa. *In vivo*, la respiración se logra normalmente por medio de ventilación a presión negativa. El diafragma se contrae y la caja torácica se expande creando una presión negativa dentro de la cavidad torácica, provocando que fluya aire dentro de los pulmones para aliviar este desequilibrio de presión. Tras la inhalación, los músculos respiratorios se relajan y el pulmón se desinfla de manera pasiva.

50 Ventilación a presión negativa es el principal modo de ventilación en el biorreactor. Con el fin de efectuar una presión negativa que rodee a los pulmones, la cámara principal del biorreactor debe ser completamente hermética. Esto se logra cerrando todas las ventilaciones de monitorización de presión y aire. Entonces, se usa una bomba de jeringa para extraer un volumen fijado de aire del biorreactor principal, creando una presión negativa. La única vía

para que la presión se alivie es que fluya medio (o aire) al interior de los pulmones por medio de la tráquea, que está conectada a un depósito separado. La bomba de jeringa invierte entonces su sentido empujando aire de nuevo al interior del biorreactor principal. Esto revierte la acumulación de presión negativa dentro de la cámara, y fluye medio (o aire) al interior del depósito de la tráquea. El pulmón se desinfla de manera pasiva durante este tiempo.

5 *La cánula traqueal utiliza una válvula de una vía:*

Tal como se representa en la figura 17, la conexión a la tráquea implica un conector en y una válvula de una vía abierta al biorreactor principal. Este tipo de conexión es necesaria debido a la fuga de fluido del compartimento de las vías respiratorias. Durante la inhalación, entra un volumen de medio en el pulmón. Sin embargo, parte de este medio se fuga a través de la membrana alveolar al interior del espacio intersticial o la vasculatura. Por tanto, no todo el medio que entra en el pulmón durante la inhalación puede devolverse al depósito traqueal durante la exhalación. El diseño mostrado en la figura 17 incorpora la característica de permitir que todo el medio entre en el pulmón durante la inhalación. Sin embargo, durante la exhalación, el medio puede regresar al depósito traqueal o bien desde el pulmón o bien desde el biorreactor principal por medio de la válvula de una vía.

El biorreactor también puede utilizar ventilación a presión positiva, conectando la bomba de jeringa directamente a la cánula traqueal o depósito traqueal.

Modificación de la entrada traqueal:

En el contexto del biorreactor, se observó que, durante la ventilación, al compartimento de las vías respiratorias del pulmón no se le suministraba suficiente medio nuevo. Sin querer restringirse a ninguna teoría particular, se cree que esto era porque en gran medida estaba ventilándose el mismo medio dentro y fuera de la tráquea debido al volumen de medio contenido en los tubos entre la tráquea y el depósito traqueal separado, entrando medio nuevo insuficiente en la tráquea. El “espacio muerto” en el bucle de flujo de medio de las vías respiratorias impedía que medio nuevo alcanzara el tejido de pulmón durante la respiración. Como resultado, se modificó el biorreactor de manera que el medio seguía una trayectoria diferente dentro y fuera del pulmón durante la ventilación, tal como se explica resumidamente en la figura 17. Debido a esta modificación, la mayor parte del medio que entra en la tráquea con cada respiración se extrajo directamente desde el depósito traqueal (y por tanto era “nuevo” en comparación con el medio que existe dentro de la tráquea).

Suministro de oxígeno durante el cultivo en biorreactor:

Se midió el contenido en oxígeno del medio de cultivo tisular en el biorreactor durante cultivos de pulmón, con el fin de garantizar que había un contenido en oxígeno suficiente. En particular, es necesario garantizar que hay un suministro de oxígeno suficiente durante la ventilación a presión negativa, durante la cual el biorreactor principal es hermético y el único portal para la entrada de oxígeno es por medio del depósito traqueal. Se encontró que la tensión de oxígeno no cae significativamente a lo largo del transcurso del cultivo, y permanecía a 6,0-7,0 mg/l, que es el mismo nivel que el nivel en medios de cultivo tisular normales. Estos niveles superaban los niveles fisiológicos normales de 80-100 mmHg (6-7 mg/l corresponden a una presión parcial de 137-159 mmHg).

35 Perfiles de presión del biorreactor

Se midieron los perfiles de presión en la tráquea y la arteria pulmonar de tejido de pulmón creado por ingeniería cultivado en el biorreactor, con el fin de garantizar que las presiones estuviesen dentro de los límites fisiológicos o esperados. La figura 18 muestra perfiles representativos. La presión de perfusión se mantuvo normalmente a entre ~2 y 30 mmHg. En el ejemplo facilitado, la presión de perfusión inicial variaba entre 10-17 mmHg. Sin embargo, los efectos de la ventilación a presión negativa se superpusieron sobre este perfil, disminuyendo por tanto la presión de perfusión hasta 0-7 mmHg durante una “respiración” a presión negativa. Este efecto se observa fisiológicamente, en el que la presión cae en la vasculatura pulmonar con la inspiración. En el biorreactor, la vena pulmonar drenaba directamente dentro de la cámara principal, que también servía como “tórax”, que es donde se creaba la presión negativa con el fin de ventilar el pulmón. Esto servía para aumentar la transmisión de presiones negativas desde el biorreactor hasta la vasculatura perfundida.

A partir del perfil de presión de perfusión, la presión “torácica” negativa máxima era de ~ -12 mmHg, aproximadamente consecuente con los valores fisiológicos. Por tanto, durante una inhalación, se ejercía esta presión negativa sobre las vías respiratorias, dirigiendo fluido (o aire) al interior de los pulmones desde el depósito traqueal. Esta presión disminuye gradualmente hasta el árbol respiratorio, y era de -3 mmHg en la entrada de la tráquea. De manera importante, la presión en la entrada a la tráquea era esencialmente cero fisiológicamente, ya que está vinculada a la presión atmosférica. Sin embargo, en el biorreactor, esta presión permanecía ligeramente negativa durante la inhalación debido a la longitud de los tubos entre la tráquea y el depósito traqueal, en donde la presión alcanza cero.

Requisitos de medio y oxígeno

55 Los siguientes resultados muestran una serie de cálculos destinados a ayudar a determinar el volumen de medio y aire requerido para un pulmón de roedor cultivado en el biorreactor.

Comparación de cultivo tisular:

5 Durante el cultivo tisular *in vitro*, es común alimentar a 5 millones de células con 12 ml de medio cada 3 días. Si se supone que el pulmón de roedor adulto contiene 100 millones de células, que corresponde a un requisito de medio de como máximo 240 ml cada 3 días. Sin embargo, esto sería una sobreestimación ya que las células en cultivo tisular están replicándose generalmente de manera activa, mientras que muchas células en un pulmón de roedor intacto son quiescentes y por tanto tienen requisitos de medios inferiores.

Requisitos de consumo de glucosa:

10 Se ha demostrado que el consumo de glucosa de un pulmón de ratón perfundido es de 43 μmol por gramo de peso seco por hora [Kerr *et al.*, 1979, Am J Physiol 236:E229-33]. El pulmón de una rata adulta tiene un peso seco de ~150-250 mg [; Inokawa *et al.*, 2006, Ann Thorac Surg 82:1219-25] mientras que el medio de cultivo tisular contiene normalmente 5,5 mmol/l de glucosa. Por tanto, el pulmón de una rata adulta requeriría 28-47 ml de medio de cultivo tisular por día con el fin de suministrar sus requisitos de consumo de glucosa.

Requisitos de oxígeno:

15 Las células endoteliales de la arteria pulmonar consumen 6 nmol de oxígeno por millón de células por minuto [Xu *et al.*, 2007, Proc Natl Acad Sci USA 104:1342-7], mientras que las células epiteliales de tipo II de rata consumen 1,25 nmol por minuto [Dobbs *et al.*, 1980, Biochim Biophys Acta 618:510-23]. Suponiendo 100 millones de células en un pulmón de rata adulta y suponiendo que todas las células en el pulmón consumen oxígeno a la tasa superior, un pulmón de rata requeriría como máximo 26 mg de oxígeno al día. El medio de cultivo tisular contiene aproximadamente 6 mg de oxígeno por litro, y el biorreactor contiene aproximadamente 300 ml de media. Por tanto, el medio puede proporcionar 1,8 mg de oxígeno con cada intercambio de medio nuevo (cada 3 días). Además, está contenido oxígeno en el aire en el biorreactor; hay aproximadamente 200 ml de aire en el biorreactor principal. El aire en el incubador contiene ~20% de O₂, que al nivel del mar y a 37°C, corresponde a ~260 mg de oxígeno por litro de aire. Por tanto el aire en el biorreactor contiene ~52 mg de oxígeno.

25 El biorreactor de la invención puede proporcionar los requisitos de medio y oxígeno de un pulmón de roedor cultivado basándose en los cálculos anteriores. De manera rutinaria, puede suministrarse un total de 240 ml de medio en el biorreactor (180 ml en el biorreactor principal y 60 ml en el depósito traqueal), y el aire en el biorreactor puede intercambiarse diariamente. Se cree que estas condiciones son suficientes para proporcionar más que los suficientes nutrientes y oxígeno a un pulmón cultivado.

Cultivo de pulmón completo

30 Con el fin de validar y optimizar el diseño del biorreactor de pulmón, se usó cultivo *in vitro* de pulmones de roedor nativos completos. Se cultivaron los pulmones durante hasta 7 días en el biorreactor. Se ha demostrado que el biorreactor proporcionaba estimulación mecánica y suministro de nutrientes suficiente para mantener la supervivencia y diferenciación celulares así como la morfología pulmonar.

35 También se usó el cultivo de pulmón nativo en el biorreactor para examinar los efectos de las condiciones del biorreactor sobre la supervivencia celular, la morfología del pulmón y el mantenimiento del estado de diferenciación celular. Se compararon inicialmente los efectos de la ventilación con aire frente a líquido (medio) sobre la morfología del pulmón. Entonces se evaluaron los efectos de la técnica de ventilación y el suministro de nutrientes sobre la supervivencia celular. También se evaluó el efecto de la presión de perfusión vascular sobre la supervivencia y diferenciación celulares. También se evaluó la capacidad del biorreactor para mantener la diferenciación celular durante cultivos de 7 días.

Efectos de la ventilación con aire frente a medio sobre la morfología del pulmón global:

45 Se evaluaron los efectos de la ventilación de pulmones cultivados en el biorreactor con o bien medio o bien aire de la sala (~20% de O₂). Se cree que la ventilación con medio ofrecería una supervivencia celular mejorada ya que esto proporcionaría un suministro de nutrientes mejorado, lo que puede ser más importante en el biorreactor ya que no hay circulación bronquial perfundida para suministrar a las vías respiratorias grandes. Sin embargo, la ventilación con aire es la condición en la que los pulmones adultos se condicionan, y el epitelio pulmonar se cultiva frecuentemente en presencia de una superficie de contacto aire-líquido, que se ha mostrado que permite un desarrollo pulmonar apropiado en pulmones de rata fetal [Funkhouser *et al.*, 1976, Biochem Biophys Res Comm 70:630-7]. Por tanto, también se diseñaron experimentos para examinar si la ventilación con medio daría como resultado una pérdida del estado de diferenciación epitelial, debido a la falta de una superficie de contacto aire-líquido.

55 Tras 3 días de cultivo, se observaron diferencias significativas entre pulmones ventilados con medio frente a aire. Tal como se muestra en la figura 19, la ventilación con medio parecía similar al pulmón nativo; sin embargo, los pulmones ventilados con aire mostraban vías respiratorias enormemente dilatadas, con residuos celulares evidentes en las vías respiratorias (figura 19C). Además, el panel central de la figura 19C) muestra que el epitelio bronquial y bronquiolar de pulmones ventilados con aire estaba completamente ausente, un hallazgo que era constante por todo

el pulmón. Además, eran evidentes espacios de aire periféricos dilatados, tal como se muestra en el panel de la derecha de la figura 19C.

También se observó que el epitelio de las vías respiratorias estaba también denudado si se perfundía medio a través de la vasculatura (además de la ventilación con aire), mientras que si se perfundía medio a través de la vasculatura sin ventilación, el epitelio de las vías respiratorias estaba intacto. Esto sugiere que la pérdida de epitelio de las vías respiratorias no se debía a una falta de suficiente medio, sino que estaba relacionada con los efectos de la ventilación con aire. Se observó que la circulación bronquial no se perfundía para ningún cultivo.

Las células epiteliales se cultivan a menudo en una superficie de contacto de aire-líquido, consecuente con sus ubicaciones fisiológicas. Se utiliza a menudo una superficie de contacto de aire-líquido (ALI) para inducir la diferenciación epitelial [Gruenert *et al.*, 1995, *Am J Physiol* 268:L347-60; Wong *et al.*, 2009, *J Clin Invest* 119:336-48; Hosokawa *et al.*, 2007, *Connect Tissue Res* 48:9-18], y una falta de una superficie de contacto de aire-líquido puede conducir a una reducción de la ciliogénesis [Ostrowski *et al.*, 1995, *Exp Lung Res* 21:957-70; Yeh *et al.*, 2007, *Laryngoscope* 117: 1439-44]. Además, una superficie de contacto de aire-líquido permite la secreción mantenida de tensoactivo por epitelio de tipo II cuando se cultiva *in vitro* [Mason *et al.*, 2002, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282:L249-58]. Por tanto, se esperaba que se produjesen diferencias en el estado de diferenciación celular en ausencia de una ALI. Sin embargo, no se observaron cambios significativos en los patrones de expresión de proteína secretora de células Clara (CCSP), proteína C tensoactiva (SPC) o acuaporina (AQP) en pulmones ventilados con medio, tal como se muestra para cultivos realizados hasta 7 días en la figura 25.

Efecto de la perfusión sobre la supervivencia celular:

Se examinó el efecto de la perfusión vascular sobre la supervivencia celular y diferenciación celular en pulmones nativos cultivados en el biorreactor, con el objetivo de determinar si la perfusión sola podía soportar el cultivo de pulmón *in vitro*, y si era así qué presión de perfusión era óptima. Lo que complicaba estos experimentos era el hecho de que, tras la explantación de un pulmón, la permeabilidad vascular aumentaba rápidamente. La perfusión de pulmón aislado usando presiones de 10 mmHg puede provocar edema pulmonar en el plazo de 10 minutos [Wierup *et al.*, 2005, *J Heart Lung Transplant* 24:379-85]. Se observó fuga vascular en el plazo de 5-10 minutos de la explantación, fugándose el 3-4% de partículas pequeñas (radio de 28 nm) a través de la membrana alveolar-capilar. Una fuga microvascular pulmonar extensa podría dar como resultado menos o incluso nada de suministro de medio a los capilares distales y estructuras venosas. Por tanto, pueden requerirse presiones de perfusión vascular superiores a los niveles fisiológicos de ~1-10 mmHg con el fin de suministrar flujo distalmente y mantener los capilares distales patentes [Li *et al.*, 2004, *Proc Natl Acad Sci USA* 101:11488-93].

Se examinó el efecto de las presiones de perfusión vascular sobre la supervivencia celular durante el cultivo de pulmón nativo de 3 días en el biorreactor. Tal como se demuestra en la figura 20, presiones de perfusión superiores de hasta 30 mmHg dieron como resultado menos células apoptóticas así como una densidad celular superior, en comparación con presiones de 10 ó 20 mmHg. Sin embargo, independientemente de la presión de perfusión, el mantenimiento de la diferenciación celular era escaso con perfusión vascular. Se observaron niveles de CCSP y SPC sustancialmente inferiores (figura 21), mientras que la expresión de acuaporina estaba casi completamente ausente. Se observó expresión de PECAM en los vasos más grandes de la vasculatura, pero se observó expresión disminuida en capilares, tal como se muestra en la figura 22. Estos experimentos demostraron que la perfusión sola no era suficiente para mantener una supervivencia celular o diferenciación celular suficiente.

Efecto de la trayectoria de flujo de medio en el compartimento de las vías respiratorias sobre la supervivencia celular:

Mientras que la ventilación con medio permitía el mantenimiento de la morfología del pulmón y la diferenciación celular, se observaron tasas significativamente superiores de células apoptóticas en pulmones cultivados con ventilación en comparación con nativos (véanse las figura 23 y 28). Se cree que esto se debía a un suministro de medio nuevo insuficiente, y por tanto se diseñaron experimentos para modificar el biorreactor con el fin aumentar el suministro de medio nuevo al compartimento de las vías respiratorias durante la ventilación. Tal como se muestra en la figura 17 y se describe en otra parte en el presente documento, hay una única línea que conecta el biorreactor principal al depósito traqueal. Esta longitud de tubos es de aproximadamente 40-45 cm y contiene 3-3,5 ml de medio. Durante la ventilación, se extraen ~2,5-3,0 ml de medio dentro del pulmón durante una inhalación a presión negativa, y se devuelve el mismo volumen de medio por medio de los tubos al tarro traqueal. Por tanto, de los ~2,5-3,0 ml de medio que entran en el pulmón durante cada "respiración", este medio no es nuevo sino que simplemente se devuelve al pulmón desde los tubos. Por tanto, el suministro de medio real al pulmón es mucho menor de lo que se administraría mediante ventilación con medio nuevo.

Se modificó el diseño del biorreactor para añadir una segunda conexión entre el pulmón en el biorreactor principal y el depósito traqueal. Usando válvulas de comprobación de una vía, se usó una conexión para el suministro de medio durante la inhalación y se usó la otra conexión para el retorno de medio durante la exhalación. Esta modificación redujo el medio "recirculado" desde ~2,5-3,0 ml hasta sólo ~0,75 ml con cada ciclo de ventilación, y por tanto aumentó enormemente el suministro de medio nuevo.

Los efectos de esta modificación del biorreactor se muestran en la figura 24, en la que se muestra que la línea de respiración adicional mejora la supervivencia celular. El porcentaje de células apoptóticas se redujo hasta el 3,9% para la ventilación de "bucle" desde el 21,5% para la ventilación con una única línea ("ventilación sólo" en la figura 27). Esto se compara con el 0,5% para pulmón nativo.

5 Mientras que la ventilación de "bucle" aumenta el suministro de medio al pulmón reduciendo la cantidad de medio "recirculado", el suministro de medio también puede aumentar con la adición de perfusión vascular. La perfusión junto con la ventilación redujo la apoptosis celular hasta el 7,9% desde el 21,5% para ventilación de una única línea sola (figura 23). La modificación de la ventilación de "bucle" aumentó ligeramente el número de células global en comparación con ventilación de una única línea (figura 23B), pero esto no era una diferencia significativa. Para la
10 ventilación tanto de una única línea como de "bucle", el número de células se redujo en comparación con nativo pero no era estadísticamente significativo.

Los resultados presentados en el presente documento demuestran que la ventilación también permite la supervivencia de tejido de pulmón nativo en el biorreactor durante cultivos de 3 días, siempre que se suministre suficiente medio nuevo al pulmón usando o bien la modificación de ventilación de "bucle" o bien perfusión vascular complementaria. La ventilación de bucle demuestra los mejores resultados globales, minimizando la apoptosis celular al tiempo que se maximiza el número de células en tejidos de pulmón cultivados.
15

Morfología celular, diferenciación celular y estructura alveolar:

Con el fin de validar más completamente el diseño del biorreactor, se realizaron cultivos de 7 días de pulmón nativo. Estos cultivos utilizaron ventilación con medio con la modificación "de bucle" descrita en otra parte en el presente documento, pero sin ninguna perfusión vascular. No se utilizó perfusión vascular, aunque podría explorarse en estudios futuros la adición de perfusión a cultivos ventilados a largo plazo usando ventilación de "bucle".
20

Se evaluaron los pulmones por medio de histología para determinar la proliferación celular, apoptosis y el mantenimiento de diferenciación celular por medio de tinción para acuaporina-5 (epitelio de tipo I), proteína C tensioactiva (epitelio de tipo II), proteína secretora de células Clara (células Clara) y PECAM-1 (endotelio). Se conservó la arquitectura pulmonar global, incluyendo la estructura alveolar, tal como se muestra en la figuras 29A y 29B. Imágenes a menos aumentos no eran distinguibles de las mostradas en la figura 19 para la respiración con medio. Además, tal como se muestra en la figuras 29C a 29J, los patrones de expresión de marcadores celulares no eran sustancialmente diferentes de pulmón nativo.
25

La ventilación sola permite la perfusión pasiva de la vasculatura del pulmón:

30 Se ha demostrado que la ventilación sola puede permitir la supervivencia celular y el mantenimiento del fenotipo celular de varios tipos de células de pulmón clave, incluyendo endotelio, durante hasta 7 días. Sin embargo, esto es en ausencia de perfusión activa de medio a través de la vasculatura, lo que era inicialmente sorprendente. Con el fin de investigar por qué la falta de perfusión no afectaba a la supervivencia o diferenciación endotelial, se realizó un experimento usando microesferas de 5 µm para investigar el efecto de la ventilación sobre el movimiento de fluido al interior de la vasculatura. Se cree que los movimientos físicos inducidos por la ventilación eran suficientes para provocar el movimiento pasivo de medio dentro y fuera de la vasculatura, que está abierta al medio en el biorreactor. En este experimento, se ventilaron los pulmones durante 3 horas en el biorreactor que se llenó con medio que contenía microesferas de 5 µm. Si se observaban microesferas en la vasculatura del pulmón, esto indica que se indujo perfusión pasiva por ventilación. Tal como se demuestra en la figura 26, se encontraron microesferas tanto en
35 vasos grandes así como en algunos capilares. Estos resultados indican que la ventilación sola es suficiente para inducir movimiento del medio en la vasculatura, permitiendo por tanto el mantenimiento del endotelio a pesar de la falta de perfusión.

Este movimiento de medio en la vasculatura es un resultado del movimiento físico del pulmón debido a la ventilación. La difusión sola sería insuficiente para mover tales partículas grandes dentro de la vasculatura. El movimiento esperado de las microesferas dentro de la vasculatura debido a difusión puede aproximarse usando la segunda ley de Fick.
40

Soporte de la supervivencia y diferenciación celulares

Los resultados presentados en el presente documento demostraron que la perfusión vascular sola no era suficiente para soportar la supervivencia celular y diferenciación celular, incluyendo la producción de tensioactivo por epitelio de tipo II. Sin embargo, la ventilación a presión negativa con medio era suficiente para soportar una supervivencia celular extensa (hasta el 95,1% de los niveles nativos) así como mantener la diferenciación de epitelio y endotelio.
45

El objetivo global de los experimentos del ejemplo era demostrar el diseño válido de un biorreactor que puede cultivar pulmones de roedor completos *in vitro* durante largos periodos de tiempo, con el objetivo de usar este biorreactor para el futuro cultivo de tejidos de pulmones creados por ingeniería. Los resultados demuestran un diseño satisfactorio que es adecuado para su uso en cultivo de pulmón creado por ingeniería.
55

Ejemplo 4: Desarrollo epitelial en tejidos de pulmones creados por ingeniería

Los resultados presentados en el presente documento demuestran que los armazones descelularizados no son citotóxicos y soportan la adherencia y proliferación de una amplia gama de tipos de células pulmonares; incluyendo células epiteliales, endoteliales y mesenquimatosas. En algunos casos, pueden usarse células madre para crear por ingeniería un tejido de pulmón. Con el fin de que el tejido de pulmón creado por ingeniería sea útil, debe poder conectarse a una vasculatura y unas vías respiratorias. Las vías respiratorias deben ser continuas con los alveolos, mientras que las conexiones vasculares deben conducir a una red capilar densa que rodea a los alveolos.

Los resultados presentados en el presente documento demuestran que el desarrollo de tejidos de pulmones creados por ingeniería se ve afectado por condiciones de biorreactor claves, incluyendo el tipo de medio, la perfusión, la ventilación, y la presencia de una superficie de contacto de aire-líquido. En algunos casos, la ventilación con medio de cultivo (es decir "ventilación con líquido") ayuda en la diferenciación de estructuras de las vías respiratorias y células epiteliales. Además, el cultivo estático de pequeños trozos de tejido creado por ingeniería en una superficie de contacto de aire-líquido presentaba efectos significativos sobre el crecimiento tisular, y que en el biorreactor, la ventilación con aire afecta a la diferenciación celular y el desarrollo de estructuras epiteliales.

Los materiales y métodos empleados en estos experimentos se describen ahora.

15 Materiales y métodos

Preparación del armazón

Se recogieron los pulmones de ratas Fischer 344 adultas y se descelularizaron tal como se describe en otra parte en el presente documento. Tras el procedimiento de descelularización, se enjuagaron los armazones en 10 cambios de agua estéril, seguido por enjuagado durante al menos 12 horas en penicilina/estreptomicina al 10% en PBS. En los cultivos posteriores, también se enjuagaron los pulmones en FBS al 10% para ayudar en la eliminación de los remanentes de ADN. Entonces se transfirieron los pulmones a un nuevo biorreactor estéril con un sistema de perfusión y respiración completo unido. Posteriormente se enjuagaron los pulmones dos veces en PBS y una vez en el medio que iba a usarse para el cultivo.

Aislamiento de células neonatales

Se aislaron los pulmones de ratas neonatales (~7 días de edad) tal como se comentó en otra parte en el presente documento. Entonces se enjuagaron los pulmones durante 10 s en etanol al 70% y se enjuagaron dos veces en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco), y luego se transfirieron a una placa de Petri seca, estéril. Se trituraron los pulmones durante 5 minutos con un bisturí, y luego se transfirieron a un tubo cónico para la digestión con elastasa. Se obtuvieron la ADNasa, colagenasa y la elastasa de Worthington Biochemical (Lakewood, NJ). Se realizó la digestión con elastasa durante 20 minutos a temperatura ambiente con agitación, usando elastasa 4 U/ml en DMEM con ADNasa 100 U/ml. Se filtraron posteriormente los trozos de tejido a través de un filtro de nailon de 70 µm y se enjuagaron en DMEM. Se transfirieron los trozos no digeridos a un tubo limpio y se digirieron con colagenasa durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación, en una disolución de colagenasa 1 mg/ml en DMEM:PBS 1:1 con Ca²⁺ y Mg²⁺. Se filtró de nuevo el tejido digerido con colagenasa a través de un filtro de 70 µm y los trozos no digeridos se aplastaron físicamente usando un émbolo de jeringa. Se enjuagó el tejido remanente con DMEM y se filtró a través de un filtro de 70 µm. Se combinaron las células de las digestiones con colagenasa y elastasa, luego se lavaron tres veces en DMEM y una vez en el medio que iba a usarse para el cultivo. Se evaluó la viabilidad celular usando exclusión de colorante azul tripano y entonces se sembraron las células en los armazones descelularizados tal como se describe en otra parte en el presente documento.

Siembra de células neonatales

Tras el aislamiento de células pulmonares y la preparación del armazón descelularizado, se suspendieron las células aisladas en el medio que iba a usarse para el cultivo. Para la siembra del compartimento de las vías respiratorias, se inyectaron 15 ml de suspensión celular por biorreactor en el depósito traqueal y se sembraron las células mediante ventilación a presión negativa para transferir las células al interior del compartimento de las vías respiratorias del pulmón. Para la siembra de la vasculatura, se inyectaron 3 ml de suspensión celular por biorreactor dentro de la arteria pulmonar. Se permitió que las células se adhirieran durante la noche sin perfusión o ventilación, tras lo cual se comenzó la perfusión y/o ventilación dependiendo de las condiciones experimentales.

Cultivo de tejido creado por ingeniería

Tras la siembra, se cultivaron los pulmones de manera estática durante la noche, tras lo cual se comenzó la perfusión o ventilación. La perfusión y ventilación variaron según las condiciones experimentales. Se reemplazó el medio de cultivo dos veces a la semana. Para las condiciones de ventilación, se ventilaron los pulmones de manera continua durante una breve pausa diariamente con el fin de permitir el intercambio manual de aire en el biorreactor. Para el cultivo de trozos de tejido creado por ingeniería, tras la siembra durante la noche, se retiraron los armazones del biorreactor y se cortaron en trozos pequeños (1-3 mm) usando tijeras estériles. Se transfirieron los trozos a placas de Petri para el cultivo y, si se indica, se transfirieron posteriormente a una placa de Petri con un inserto de filtro de 0,4 µm para el cultivo en superficie de contacto de aire-líquido.

Citometría de flujo

Tras el aislamiento de células, se enjuagaron las células en tampón (PBS con EDTA 2 mM y albúmina sérica bovina al 0,5%). Para la tinción de antígenos intracelulares, se fijaron las células con formaldehído al 1% durante 15 minutos a temperatura ambiente, luego se permeabilizaron con triton-X al 0,2% en PBS. Se aplicaron anticuerpos primarios en tampón durante 30 minutos a TA a una dilución 1:100. Tras 3 enjuagados en tampón, se aplicaron anticuerpos secundarios durante 20 minutos a temperatura ambiente a una dilución 1:100. Se analizaron las células en máquinas FACSCalibur de Becton-Dickinson en la instalación de Clasificación Celular de la Facultad de Medicina de Yale.

Ahora se describen los resultados de los experimentos.

10 El armazón no es citotóxico

Inicialmente, se usó MLE-12, una línea de células epiteliales derivadas de tumor para experimentos de cultivo preliminares sobre los armazones de pulmón descelularizados. Se realizaron estos experimentos para demostrar que el armazón no era citotóxico, así como para demostrar la validez de primer orden del sistema de biorreactor para cultivos que utilizan armazones descelularizados. Se observó que la línea celular MLE-12 presentaba un robusto crecimiento celular durante periodos de cultivo de hasta 10 días sobre armazones descelularizados en el biorreactor, con perfusión de medio a través de la vasculatura. La histología se demuestra en la figura 27. Las células parecían formar estructuras alveolares muy primitivas a los 3 días, pero posteriormente proliferaban extensamente, y se muestra crecimiento celular no controlado a los 7 días, un desenlace esperado ya que ésta es una línea celular derivada de tumor. Estos experimentos eran una etapa preliminar en la validación del biorreactor y los armazones de pulmón descelularizados, y justificaron la experimentación posterior usando células pulmonares neonatales recién aisladas.

Recogida de células pulmonares neonatales

Se eligieron células pulmonares neonatales por varios motivos, incluyendo la capacidad para aislar un gran número de células que representan una mezcla heterogénea de tipos de células pulmonares, porque el epitelio de pulmón de roedor es difícil de cultivar *in vitro* y porque las células pulmonares de ratas neonatales son jóvenes y relativamente plásticas [Massaro *et al.*, 1985, J Clin Invest 76: 1297-305; Meyrick *et al.*, 1982, Am Rev Respir Dis 125:468- 73].

Se optimizaron las condiciones para el aislamiento de células basándose en el número de células, la viabilidad y la distribución de tipos de células basándose en citometría de flujo. Los marcadores primarios usados fueron proteína C tensioactiva (SPC; neumocitos de tipo II), acuaporina-5 (AQP; neumocitos de tipo I), proteína secretora de células Clara (CCSP; células Clara) y molécula de adhesión de células endoteliales a plaquetas-I (PECAM -1; células endoteliales). Las condiciones para el aislamiento de células se eligieron como un resultado de experimentos repetidos que optimizaban el número de células y la viabilidad. Se optimizó la selección de enzimas y las condiciones de incubación basándose en la viabilidad y el rendimiento de células, tal como se evaluó mediante el número total de células, la exclusión colorante azul tripano y análisis de citometría de flujo.

En la figura 28 se muestran datos de citometría de flujo de un aislamiento de pulmón de muestra que se obtuvieron en un régimen de aislamiento "optimizado". En un aislamiento típico, el 5-10% de las células son positivas para CCSP, el 40-60% de las células son positivas para SPC, el 2-8% de las células son positivas para AQP, el 1-2% de las células son positivas para citoqueratina-14, el 10-30% de las células son positivas para PECAM-I y el 5-10% de las células son positivas para actina α . Usando preparaciones de citocentrifugación, se confirmó la tinción para CCSP y SPC. Aunque la mayoría de estos porcentajes están dentro del intervalo esperado, se esperaría un rendimiento superior de neumocitos de tipo I (positivos para AQP), basándose únicamente en su prevalencia en pulmón nativo. Sin embargo, los neumocitos de tipo I son muy frágiles y es improbable que muchos de ellos sobrevivan al procedimiento de recogida de células. El rendimiento celular total a partir de una camada de 30 crías (7-12 crías) era de aproximadamente 100 millones de células, con una viabilidad del 75-85%.

45 Identificación preliminar de las condiciones de biorreactor para cultivo de pulmón creado por ingeniería

Se diseñaron experimentos para explorar diversas variables y condiciones adecuadas basándose principalmente en la densidad, viabilidad y morfología celulares por medio de histología, así como algo de evaluación de la expresión de proteínas. Las condiciones que se evaluaron se abordan brevemente a continuación.

Elección del medio: Se evaluaron varias composiciones de medio, variando tanto el medio de base como la concentración de suero. Se observó repoblación epitelial, principalmente epitelio de tipo II, usando varias condiciones de medio, incluyendo BGJb (libre de suero), DMEM con FBS al 10%, EGM-2 con FBS al 15% y una mezcla 3 partes a 1 de EGM-FBS al 2+15% y BGJb. Los tipos de medio BGJb y DMEM+FBS al 10% proporcionaron condiciones superiores para el crecimiento epitelial global, basándose en histología y tinción de inmunofluorescencia. Como resultado, se usaron estos medios para experimentos posteriores. Sin embargo, la invención no debe limitarse a ningún medio específico. Esto se debe a que puede usarse cualquier medio que promueva la proliferación y diferenciación deseadas.

Perfusión y ventilación: Se usaron tanto perfusión como ventilación durante los experimentos preliminares. Por ejemplo, se perfundieron los cultivos a 2-5 ml/min con el fin de proporcionar un suministro de nutrientes. También se evaluó el efecto de ventilación una vez al día con una única respiración. Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas en los cultivos de pulmón creado por ingeniería resultantes. A pesar de no observar un claro beneficio de la ventilación una vez al día, se decidió que este nivel mínimo de ventilación proporcionaría un entorno de cultivo más fisiológico. Por tanto, para la mayoría de los experimentos posteriores, se perfundieron los cultivos y se ventilaron una vez al día con una única ventilación.

Armazones descelularizados soportan el crecimiento de células epiteliales, endoteliales y mesenquimatosas

Se diseñaron los siguientes experimentos para demostrar la validez de los armazones descelularizados, el biorreactor de pulmón y la población de células pulmonares neonatales aisladas para el desarrollo de tejido de pulmón creado por ingeniería. En la tabla 1 se identifican las condiciones precisas usadas en el cultivo de estos tejidos creados por ingeniería. También se describen en la tabla las condiciones que se investigaron específicamente para evaluar los efectos de esas condiciones sobre el crecimiento de tejido creado por ingeniería. Sin embargo, la invención no se limita a estas condiciones. Más bien, cualquier condición aplicable se abarca en la invención siempre que las condiciones promuevan la generación de un pulmón creado por ingeniería en el contexto del biorreactor.

Tabla 1: Condiciones de Biorreactor para cultivo de pulmón creado por ingeniería

| Condición | Medio | Ventilación | Perfusión | Duración del cultivo |
|--|--------------------------------------|--|-----------|----------------------|
| Validación | BGJb; DMEM+FBS al 10% | Continua; una vez al día | 2 ml/min | 4-8 días |
| Perfusión | DMEM+FBS al 10% | Ninguna | 2 ml/min | 8 días |
| Ventilación | DMEM+FBS al 10% | Continua con medio | 2 ml/min | 8 días |
| Superficie de contacto de aire-líquido | DMEM+ FBS al 10% | Continua con medio durante 4 días, luego aire durante 4 días | Ninguna | 8 días |
| Selección de medio | Transición de DMEM+FBS al 10% a BGJb | Continua | Ninguna | 8 días |

Demostración de la repoblación de células epiteliales

Los resultados presentados en el presente documento demuestran la adherencia y proliferación de células epiteliales sobre armazones de pulmón descelularizados. Para estos experimentos, se usaron medio DMEM + FBS al 10%, perfusión de la vasculatura a 2 ml/min, ventilación una vez al día, armazones descelularizados no recubiertos y poblaciones de células pulmonares neonatales no clasificadas (las condiciones “optimizadas” descritas en otra parte del presente documento).

La figura 29 muestra la tinción con H&E de tejido de pulmón creado por ingeniería. A los 4 días, se observó un número significativo de estructuras epiteliales en desarrollo con revestimiento epitelial cuboidal, organizadas, mientras que a los 8 días, se observaron menos de tales estructuras y muchas células adoptaron un fenotipo más maduro. A los 4 días, muchas células estaban en proliferación, mientras que a los 8 días, se observaron menos células en proliferación (figura 30). Tanto a los 4 días como a los 8, no se observaron números significativos de células apoptóticas (figura 31).

Se usó la inmunofluorescencia para documentar la expresión de marcadores de células epiteliales clave, usando acuaporina-5 para neumocitos de tipo I, proteína C tensioactiva para neumocitos de tipo II y proteína secretora de células Clara para células Clara. Las células epiteliales de tipo II predominaron generalmente en los cultivos, especialmente en puntos de tiempo posteriores, tal como se muestra en la figura 33. Se observaron células Clara a altas densidades a los 4 días, con menos células a los 8 días (figura 32). También se observó la tinción para acuaporina a los 4 días, aunque se observó significativamente menos tinción de acuaporina en puntos de tiempo posteriores (figura 34).

Se observó que la tinción de acuaporina para epitelio de tipo I representa células que son de conformación cuboidal a los 4 días de cultivo, lo que va en contra de su morfología plana habitual, como las células que revisten los alveolos en pulmones funcionales. Además, estas células cuboidales también se tiñen con frecuencia de manera positiva para o bien SPC o bien CCSP, tal como se observa en las figuras 36 y 37. Por tanto, es improbable que las

células que expresan acuaporina a los 4 días sean epitelio de tipo I maduro, tal como se sugeriría por una morfología aplanada y la expresión de acuaporina sin otros marcadores.

5 Los neumocitos de tipo I se derivan *in vivo* de células epiteliales de tipo II, que son una célula precursora residente localmente para el epitelio alveolar. En pulmones nativos durante el desarrollo, los neumocitos de tipo I no logran el estado de diferenciación final en ausencia de movimientos respiratorios fetales [Inanlou *et al.*, 2005, *Dev Dyn* 233:772-82] y siguen siendo de conformación cuboidal en histología y TEM [Inanlou *et al.*, 2005, *Histol Histopathol* 20:1261-6].

10 La carencia de diferenciación en neumocitos de tipo I no fue sorprendente en estos cultivos que no se ventilaron de manera regular. Las células que sí expresan acuaporina surgen lo más probablemente de una célula precursora local que no se había diferenciado totalmente en epitelio de tipo I. Por tanto, los armazones descelularizados pueden soportar la unión y proliferación de epitelio pulmonar. Se observó un crecimiento robusto de epitelio de tipo II, así como de células Clara y células que son probablemente los precursores para células epiteliales de tipo I totalmente diferenciadas. Se observan estos hallazgos en condiciones de perfusión de medio a través de la vasculatura con sólo movimientos respiratorios ocasionales.

15 Repoblación de células progenitoras epiteliales

Se observó el crecimiento de dos tipos de células progenitoras epiteliales pulmonares sobre los armazones descelularizados. Se notifica que las células que son doble positivo para CCSP y SPC son células progenitoras locales, denominadas células madre broncoalveolares, que pueden diferenciarse tanto en células Clara como en neumocitos de tipo II y se encuentran en la unión de conductos broncoalveolares [Lane *et al.*, 2007, *Regenerative Medicine* 2:407-15; Kim *et al.*, 2005, *Cell* 121:823-35]. La figura 35 muestra tales células doble positivas, que se encuentran en estructuras que concuerdan con la aparición de bronquiolos terminales, la ubicación fisiológica esperada de estas células.

25 Las células basales son una célula madre local para las vías respiratorias pulmonares; residen por debajo del epitelio columnar y sirven como fuente de células regenerativas para el epitelio de las vías respiratorias proximales. La figura 36 demuestra células que son positivas para citoqueratina-14, que es un marcador de células basales. Para comparación, se muestra pulmón nativo en la figura 36A. Además, la doble tinción para citoqueratina-14 y CCSP se muestra en la figura 37, que también demuestra que las células Clara revisten las vías respiratorias y las células basales que se encuentran por debajo de ellas, lo que concuerda con sus ubicaciones anatómicas normales. Estas células se encuentran a veces por debajo de estructuras de vías respiratorias más grandes, lo que concuerda con su ubicación en pulmón nativo (figura 36B), pero también se encuentran en agrupaciones que no parecen estar asociadas con las vías respiratorias grandes (figura 36C).

35 Además del crecimiento de células epiteliales y endoteliales, las células mesenquimatosas puede repoblar los armazones de pulmón descelularizados. La figura 38 muestra la tinción de inmunofluorescencia de α -actina, que tiñe el músculo liso y los miofibroblastos. Se cultivaron estos tejidos creados por ingeniería en las mismas condiciones que se mostró que favorecían el crecimiento epitelial. También se observó que células mesenquimatosas se encontraban ubicadas por debajo y entre las estructuras epiteliales en desarrollo, lo que concuerda con su ubicación en pulmón nativo. Por tanto, los resultados presentados en el presente documento demuestran que los armazones descelularizados también son sustratos adecuados para el crecimiento de células mesenquimatosas, y que las células mesenquimatosas viables estaban contenidas dentro de la población de células pulmonares neonatales.

40 Efecto de la composición de los medios sobre la diferenciación epitelial

El tipo de medio puede tener efectos significativos sobre el crecimiento y la diferenciación celular, y por tanto sobre el desarrollo de tejidos de pulmón creados por ingeniería. Para investigar algunas de estas diferencias con más detalle, se comparó el crecimiento de cultivos de pulmón creado por ingeniería usando un medio libre de suero (BGJb) frente a un medio que contiene suero (DMEM + FBS al 10%) con diferenciación epitelial. En estos experimentos, en primer lugar se sembraron células sobre los armazones en DMEM + FBS al 10% y se permitió su cultivo en este medio durante 2 días, después de lo cual se produjo una transición gradual durante 4 días a medio BGJb (libre de suero), con los 2 días de cultivo finales en medio BGJb puro. La transición a medio libre de suero provocó efectos sustanciales sobre la expresión de tensioactivo. Se observó que el medio libre de suero conduce a una expresión más apical de tensioactivo (SPC) en comparación con DMEM + FBS al 10% (figuras 39C y 39D). Esto corresponde a una expresión aumentada significativamente de tensioactivo en inmunotransferencia de tipo Western con el medio libre de suero (BGJb) (figura 40; compárense los carriles etiquetados como "DMEM" y "BGJb"). Además, la forma de tensioactivo concordaba mucho más con pulmón nativo (con la mayor parte de tensioactivo indicado como la forma de pro-SPC de 21 kDa en medio BGJb).

55 Además, la transición al medio libre de suero conduce a una disminución de la expresión de CCSP, indicada mediante la inmunofluorescencia en las figuras 43F y 43E). En ambos tipos de medio, se observó expresión difusa de CCSP en las luces de las estructuras epiteliales en desarrollo. Se cree que este fenotipo se debía a la falta de perfusión o ventilación, ya que estos cultivos se realizaron en pequeños cortes de tejido.

Efecto de la interfase aire-líquido sobre el desarrollo de pulmón en el biorreactor

Para crear una interfase aire-líquido, se cultivaron los pulmones creados por ingeniería en primer lugar durante 4 días con ventilación con medios, para permitir la unión y proliferación celular. Durante los 4 días de cultivo finales, se cambió la ventilación de medios a aire ambiental filtrado.

5 La ventilación con aire produjo un grave daño al epitelio de las vías respiratorias así como cambios destructivos en algunas paredes alveolares (figura 19). Por tanto, el volumen corriente usado para la ventilación con aire se redujo en aproximadamente el 50%, con respecto al valor anterior de ~2,0-2,5ml para respiración de aire o líquido en un esfuerzo por reducir el daño provocado a los pulmones nativos por la ventilación con aire.

10 No se observaron cambios en la unión o morfología celular debidos a la presencia de la ventilación con aire en el biorreactor. Sin embargo, se observó que la ventilación con aire en pulmones creados por ingeniería cultivados en el biorreactor condujo a la expresión inducida de acuaporina, un marcador de diferenciación para epitelio de tipo I. Esto se observó tanto en células en el parénquima, que normalmente se tiñen solamente para proteína C tensioactiva (indicativo de epitelio de tipo II) así como la tinción ocasional de células cuboidales en estructuras epiteliales en desarrollo. Los patrones de tinción observados indican que es altamente probable que la mayor parte de las células que expresan acuaporina también expresen SPC. Tal como puede observarse a partir de la figura 42B, prácticamente todas las células en el parénquima expresan SPC, mientras que un subconjunto de las células parenquimatosas expresan AQP (figura 41A).

20 Estos hallazgos sugieren enormemente que la interfase aire-líquido induce diferenciación de epitelio de tipo II a epitelio de tipo I. El epitelio de tipo II es una célula progenitora local conocida para el epitelio de tipo I, y así esta diferenciación no es sorprendente [Adamson *et al.*, 1974, Lab Invest 30:35-42; Fehrenbach, 2001, Respir Res 2:33-46]. Además, se observó la expresión reducida de proteína C tensioactiva en pulmones creados por ingeniería ventilados con aire, tal como se muestra en la figura 40 (compárense los carriles "ALI" con los pulmones que se ventilaron con medio ("Vent") y se perfundieron ("Perf")). Esto también concuerda con la diferenciación de epitelio de tipo II a tipo I. Además, se observó el crecimiento de varias células epiteliales ciliadas, tal como se muestra en la figura 42. Esto es probablemente el resultado de la introducción de una interfase de aire. Cuando se cultiva epitelio de las vías respiratorias *in vitro*, la transición de las células de líquido a la interfase de aire induce expresión de cilios [You *et al.*, 2002, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 283:L1315-21; Davidson *et al.*, 2004, J Cyst Fibros 3 supl. 2:59-62]. Además, la falta de una interfase aire-líquido puede conducir a una ciliogénesis reducida [Ostrowski *et al.*, 1995, Exp Lung Res 21:957-70; Yeh *et al.*, 2007, Laryngoscope 117: 1439-44]. Por tanto, en algunos casos, la interfase de aire tiene impactos importantes sobre la regeneración de tejido de pulmón *in vitro*.

30 Efecto de la perfusión y ventilación sobre el desarrollo de estructuras epiteliales en tejidos de pulmón creados por ingeniería

La perfusión y ventilación pueden tener impactos significativos sobre el cultivo de tejido de pulmón en el biorreactor. La ventilación también tiene impactos significativos sobre el desarrollo epitelial del pulmón, incluyendo la diferenciación de neumocitos de los tipos I y II [Inanlou *et al.*, 2005, Histol Histopathol 20:1261-6; Inanlou *et al.*, 35 2005, Dev Dyn 233:772-82; Inanlou *et al.*, 2005, Dev Dyn 232:43-54]. Como resultado, se compararon los efectos de la perfusión y ventilación sobre el desarrollo de pulmón creado por ingeniería durante cultivos de 8 días en el biorreactor. Para estos experimentos, las condiciones fueron las mismas utilizadas durante los experimentos de validación comentados en otra parte, con medio de cultivo de DMEM + FBS al 10%, armazones no recubiertos y una población de células pulmonares neonatales no clasificadas. Sin embargo, los cultivos o bien se perfundieron a 40 través de la vasculatura a 2 ml/min o bien se ventilaron de manera continua con medio a 1 respiración/min.

Muchas de las células que forman estructuras epiteliales se tiñen de manera positiva para CCSP, tal como se muestra en la figura 50. Se observó la tinción para CCSP en cultivos ventilados, pero las células obtuvieron una morfología más aplanada. Esto puede indicar que la ventilación está induciendo que las células que expresan CCSP se diferencien hacia epitelio alveolar (neumocitos o bien de tipo I o bien de tipo II).

45 En ausencia de ventilación, se llenaron las luces de las estructuras epiteliales en desarrollo con un material eosinófilo, y por tanto probablemente proteico, visible sobre la tinción con H&E en la figura 43. Este material también se tiñó positivo para CCSP, tal como se observa en la figura 45.

Esta acumulación de CCSP indica que las células Clara que revisten estas estructuras epiteliales están produciendo CCSP. Además, la retirada de este material con ventilación indica que el árbol respiratorio está todavía intacto y 50 puede conducir fluido, y sugiere además que estas estructuras epiteliales en desarrollo forman parte del árbol respiratorio y no proliferan aleatoriamente dentro de la matriz.

La perfusión frente a la ventilación no tuvo efectos significativos sobre la expresión de SPC, tal como se muestra en la figura 46. La mayoría de las células fueron positivas para SPC tanto en condiciones de ventilación como de perfusión.

55 Ejemplo 5: Desarrollo endotelial en tejidos de pulmón creados por ingeniería

Se diseñaron los siguientes experimentos para determinar si los armazones descelularizados pueden soportar el crecimiento de endotelio de pulmón creado por ingeniería, y para evaluar los efectos de varios factores específicos

sobre el desarrollo de endotelio creado por ingeniería, centrándose en la capacidad de estos factores para tener un impacto sobre la formación de una barrera endotelial funcional entre los compartimentos vascular y de las vías respiratorias.

Los materiales y métodos empleados en estos experimentos se describen a continuación.

5 **Materiales y Métodos**

Preparación de armazones

Se prepararon armazones descelularizados tal como se describe en otra parte del presente documento.

Aislamiento y siembra de células neonatales

Se aislaron células pulmonares de rata neonatales tal como se describe en otra parte del presente documento.

10 Se sembraron las células en los armazones tal como se describe en otra parte del presente documento.

Cultivo de células endoteliales

Se obtuvieron células endoteliales microvasculares de pulmón de rata de VEC Technologies (Rensselaer, NY) y se hicieron crecer sobre recipiente de cultivo tisular recubiertos con fibronectina (~ 1 µg/cm², Gibco) en medios completos MCDB-131 que incluían FBS al 10% y factores de crecimiento complementarios (VEC Technologies).

15 Condiciones optimizadas para cultivo endotelial creado por ingeniería

Se recubrieron armazones con 1 mg de fibronectina (Gibco) se perfundieron a través de la vasculatura en 60 ml de PBS a 37° C, luego se enjuagaron con PBS y medios. Se sembró cada armazón dos veces en los días 0 y 2 ó 3 de cultivo con 8-10 millones de EC microvasculares de pulmón de rata en cada punto de tiempo (se usaron dos matraces de cultivo T150 por pulmón para cada una de dos siembras). Se tripsinizaron las células a partir de placas de cultivo tisular usando tripsina al 0,25% (Gibco), se filtraron a través de un filtro de 40 µm para retirar los agregados de células y se inyectaron en la arteria pulmonar como una única inyección en bolo en ~3 ml de medios. Después de permitir la adherencia celular durante 1 hora, se comenzó la perfusión a través de la vasculatura a ~1,5 ml/min. Después de 1-2 horas, se aumentó la velocidad de perfusión hasta 3 ml/min durante el resto del periodo de cultivo de 7 -10 días. Se cambió el medio cada 3-4 días.

25 Inmunofluorescencia

Se prepararon muestras de tejido y se tiñeron tal como se describe en otra parte del presente documento.

Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Se prepararon muestras y se analizaron tal como se describe en otra parte del presente documento.

Retención de micropartículas

30 Se desarrolló un ensayo para evaluar la permeabilidad de pulmones de rata completos para partículas pequeñas, que tienen tamaños del orden de macromoléculas grandes. En este ensayo, se cuantificó la fuga de una disolución de dextrano marcado con FITC a través de la barrera de las vías respiratorias-vascular. Se obtuvo dextrano marcado con FITC con un peso molecular de 2.000.000 Da de Sigma (St Louis, MO). Se realizó un ensayo de validación midiendo la permeabilidad de pulmón nativo y pulmón nativo que se trató con tripsina al 0,025% durante 2 min. Se perfundieron los pulmones con PBS heparinizada y se conectaron a las cánulas del biorreactor habituales. Se obtuvo una muestra de lavado de nivel inicial, y luego se perfundió el pulmón tratado con tripsina con 10 ml de Tripsina al 0,025% en PBS y se permitió que permaneciera durante 2 min a TA, luego se enjuagó con 10 ml de PBS. Se inyectó la disolución de dextrano marcado con FITC (1 mg/ml) en la arteria pulmonar, y luego se lavó con 20 ml de PBS. Se tomaron inmediatamente dos muestras de lavado en sucesión de la tráquea. Se midió la fluorescencia usando un lector de placas de fluorescencia y se ajustaron los datos a una curva patrón. Cuando se realizó con pulmones descelularizados o creados por ingeniería, se realizó el ensayo a través de las vías respiratorias, como con el ensayo de microesferas (véase la sección 3.2.9). Por tanto, se inyectaron los FITC-dextranos en las vías respiratorias, y se lavó la vasculatura con PBS.

Los resultados de los experimentos se describen a continuación.

45 *Fuente de células:* Se usó una fuente adquirida comercialmente de EC microvasculares de pulmón de rata. Cuando se sembraron estas células en los armazones que se recubrieron con fibronectina y se cultivaron en presencia de medio específico de EC, se observó un crecimiento sustancial de células endoteliales, tal como se muestra en la figura 47.

Resumen de experimentos de examen endotelial: Los experimentos de examen comentados en otra parte del

presente documento permitieron la identificación de un conjunto de condiciones que era compatible con el cultivo endotelial creado por ingeniería. Se evaluaron principalmente los desenlaces mediante histología para determinar la viabilidad y expresión celular de PECAM en inmunofluorescencia. El resultado de estos estudios piloto fue un conjunto de condiciones que permite el crecimiento de células endoteliales en el interior de los armazones, de tal manera que puede evaluarse sistemáticamente el impacto de condiciones discretas sobre endotelio de pulmón creado por ingeniería.

Las condiciones que se identificaron como adecuadas para el cultivo de endotelio creado por ingeniería fueron: el uso de una población expandida *in vitro*, purificada de EC microvasculares de pulmón de rata; armazones recubiertos con fibronectina; y el uso de medio específico de EC (MCDB-131 con FBS al 10% y factores de crecimiento complementarios).

Validación del ensayo de permeabilidad de FITC-dextrano

Se desarrolló un ensayo para evaluar la permeabilidad de pulmones de rata completos para partículas pequeñas, que tienen tamaños del orden de macromoléculas grandes. En este ensayo, se cuantificó la fuga de una disolución de dextrano marcado con FITC a través de la barrera de las vías respiratorias-vascular. Puede usarse este ensayo repetidamente a lo largo del transcurso de un cultivo, implica materiales que son respetuosos con el cultivo celular, y proporciona una medida de la permeabilidad de todo el pulmón. Además, si se realiza el ensayo inmediatamente antes de la fijación, podría identificarse el FITC-dextrano en secciones histológicas usando anticuerpos anti-FITC.

El dextrano marcado con FITC tiene un peso molecular de 2.000.000 Da. Para un dextrano monodisperso, el radio de Stokes-Einstein (nm) está relacionado con el peso molecular mediante $r_s = 0,0488(\text{PM})^{0,437}$ [Venturoli *et al.*, 2005, *Am J Physiol Renal Physiol* 288:F605-13; Oliver *et al.*, 1992, *J Am Soc Nephrol* 3:214-28]. Para un dextrano de 2 MDa, esto produce un radio de 27,7 nm. Se validó este ensayo evaluando la permeabilidad de pulmón nativo y pulmón nativo que se hizo que "tuviera fugas" mediante breve perfusión de la vasculatura con tripsina diluida. Se inyectó la disolución de dextrano marcado con FITC en la arteria pulmonar, y luego se lavó con solución salina. Se tomaron inmediatamente dos muestras de lavado en sucesión de la tráquea. Tal como se muestra en la figura 48, se aumenta la permeabilidad del pulmón mediante el tratamiento con tripsina, tal como se esperaba debido a la perturbación de la unión endotelial a la membrana basal. Sin embargo, incluso el pulmón nativo proporcionó una fuga mediante este ensayo. Esta degradación de la permeabilidad vascular es el resultado de retrasos entre el sacrificio animal y la inyección del dextrano, así como la manipulación del tejido de pulmón.

Cuando se realizó con pulmones descelularizados o creados por ingeniería, se realizó el ensayo a través de las vías respiratorias, como con el ensayo de microesferas. Por tanto, se inyectaron los FITC-dextranos en las vías respiratorias, y se lavó la vasculatura con solución salina. Se midieron los dextranos que se translocaron al compartimento vascular como fuga. Se realizaron los ensayos de este modo porque en pulmones descelularizados o creados por ingeniería, el tejido es altamente permeable a fluido y no puede obtenerse una muestra de retorno después de un lavado de las vías respiratorias.

Como tal, se inyectó el dextrano en las vías respiratorias como un único lavado en bolo, y se lavó la vasculatura para medir la fuga de FITC-dextranos a través de la barrera de las vías respiratorias-vascular.

Efectos de la perfusión frente a la ventilación sobre endotelio de pulmón creado por ingeniería

Se diseñaron los siguientes experimentos para evaluar los efectos de condiciones específicas sobre el desarrollo de tejidos endoteliales creados por ingeniería, centrándose en la formación de una barrera endotelial funcional. Se compararon los efectos del cultivo de endotelio de pulmón creado por ingeniería con perfusión frente a ventilación. Se evaluaron tanto la ventilación como la perfusión con respecto a la supervivencia y proliferación de células epiteliales y la formación de uniones intercelulares usando EM de transmisión.

Se observó que la perfusión mejoraba sustancialmente el crecimiento de endotelio de pulmón creado por ingeniería, tal como se muestra en la histología de la figura 48. Además, se observaron más células apoptóticas con ventilación, tal como se muestra en la figura 49 y concuerda con su escasa aparición en histología con H&E.

Además, se analizaron cultivos perfundidos y ventilados para determinar la presencia de uniones celulares usando EM de transmisión y tinción de VE-cadherina. Las uniones estrechas entre células endoteliales son un medio importante de función de barrera, ya que unen estrechamente células colindantes entre sí y, por tanto, inhiben el movimiento de fluido entre estos espacios paracelulares [Majno *et al.*, 1961, *J Biophys Biochem Cytol.* 11:571-605]. Si estas uniones celulares son débiles o están ausentes, puede producirse una fuga de fluido hacia fuera de la vasculatura y provocar edema pulmonar [Orfanos *et al.*, 2004, *Intensive Care Med* 30: 1702-14; Maniatis *et al.*, 2008, *Vascular Pharmacology* 49:119-33].

Usando TEM, se observaron las uniones intercelulares en los tejidos creados por ingeniería perfundidos, tal como se muestra en la figura 50. No todas las células demostraron la formación de uniones estrechas.

Se evaluó la formación de uniones celulares usando inmunofluorescencia para VE-cadherina. Se encontró una tinción robusta para VE-cadherina en endotelio de pulmón creado por ingeniería perfundido, tal como se muestra en

la figura 51. Los tejidos ventilados no se tiñeron para VE-cadherina debido a su escasa aparición en histología y TEM.

Evaluación de la función de barrera del endotelio de pulmón creado por ingeniería

5 Se diseñaron los siguientes experimentos para evaluar la capacidad del endotelio de pulmón creado por ingeniería para formar una barrera funcional entre el lecho vascular y los espacios de aire. Esto es importante para reducir la fuga de fluido a los alveolos y, por tanto, permitir el intercambio de gases, y es un componente clave de los objetivos para el tejido de pulmón creado por ingeniería. Para evaluar la función de barrera proporcionada por el endotelio de pulmón, se usó un ensayo de permeabilidad para medir la translocación de partículas de FITC-dextrano pequeñas (55 nm) de los espacios de aire a la vasculatura. Se desarrolló y se validó este ensayo tal como se describe en otra parte del presente documento.

15 Para este ensayo, se inyectó FITC-dextrano en el compartimento de las vías respiratorias, y se midió la cantidad que se fugó a través de la barrera alveolar-vascular lavando la vasculatura con solución salina. Para armazones descelularizados, no hubo esencialmente función de barrera para tales partículas pequeñas, translocándose prácticamente la totalidad (el 98,4%) del dextrano a los alveolos en la vasculatura y recuperándose con enjuagado vascular. Esto se compara con pulmón nativo, que cuando se trató de manera similar muestra una fuga del 12,9% (figura 52).

En tejidos endoteliales de pulmón creado por ingeniería que se perfundieron, se demostró una retención de hasta el 30% de dextranos en el compartimento de las vías respiratorias, después de periodos de cultivo de 7 -10 días. Los tejidos endoteliales ventilados demostraron una permeabilidad del 87%.

20 Estos hallazgos para endotelio de pulmón creado por ingeniería perfundido, especialmente cuando se combinan con los hallazgos de la expresión robusta de VE-cadherina mediante inmunofluorescencia (figura 51) y la formación de uniones intercelulares mediante TEM, indican que se ha producido la formación de una barrera endotelial funcional en tejidos endoteliales creados por ingeniería.

25 La figura 63 es un gráfico que representa la resistencia a la rotura por tracción de tejidos creados por ingeniería. También se muestran las resistencias mecánicas de pulmón nativo y descelularizado. Esta figura muestra que la tensión de rotura a la tracción de los tejidos creados por ingeniería es comparable tanto para pulmón nativo como para matriz descelularizada. Por tanto, las propiedades mecánicas de pulmones creados por ingeniería tisular se mantienen después del proceso de recelularización.

Ejemplo 6: Terapia con células de pulmón

30 Los resultados presentados en el presente documento demuestran el uso de tejidos de pulmón descelularizados para realizar terapia con células de pulmón en un mamífero. Generalmente, las etapas incluyen descelularización de una tráquea, detección de componentes de la matriz extracelular dentro del tejido descelularizado de tráquea, cultivo de células epiteliales pulmonares o bien bronquiales humanas (vías respiratorias grandes) o bien de vías respiratorias pequeñas sobre la matriz descelularizada de tráquea, terapia génica de células epiteliales pulmonares humanas con un gen deseado, e instilación de células epiteliales pulmonares humanas en pulmón mediante instilación, con verificación de la unión y supervivencia celular en el pulmón del receptor.

Descelularización de tráquea

40 Se extrajo tráquea de cerdo y se enjuagó en PBS para retirar la sangre. Se cortó un trozo y se fijó con formalina tamponada neutra al 10%, se incrustó en parafina y se cortó en secciones de 5 mm. Se cortó el resto en 5 anillos y se incubaron en tampón CHAPS (pH 13,5) con agitación durante 2-24 horas, cambiándose el tampón CHAPS en los puntos de tiempo de 2 h, 4 h y 8 h.

En el tiempo indicado, se retiró el tejido del tampón CHAPS y se enjuagó con PBS. Se cortó un trozo y se fijó con formalina al 10% y se procesó para análisis histológico para confirmar la descelularización.

45 Se observó que la tráquea descelularizada preparada con incubación en tampón CHAPS durante 4-8 horas mantenía la matriz de colágeno y tenía la mayor parte de las células retiradas del tejido (excepto la capa de cartílago). Véase la figura 55. Los siguientes experimentos se basaron en la incubación con CHAPS durante 6 h con agitación para la preparación de tráquea descelularizada.

50 Se diseñaron estos experimentos para detectar matriz extracelular en tráquea antes y después de la descelularización. En resumen, se cortó un trozo de tejido de tráquea nativa y descelularizada y se fijó con formalina al 10%. Se tiñeron secciones incrustadas en parafina de 5 µm con H&E y tinción tricrómica de Masson. También se inmunotiñeron secciones incrustadas en parafina para detectar proteínas de matriz extracelular incluyendo colágeno (COL), fibronectina (FN) y laminina (LN). Se desparafinizaron las secciones, se rehidrataron, se recuperó el antígeno (usando proteinasa K) y se bloquearon. Se aplicaron anticuerpos de conejo anti-FN, COL I, COL III, COL IV, COL V o LN humanos producidos de manera interna a las secciones, seguido por IgG de cabra anti-conejo conjugada con Alexa Fluor 546. Se contratificaron los cortes con DAPI. Se observó que la tráquea nativa se tiñó de manera positiva

para COL I, COL III, COL V, pero para las demás proteínas de la ECM. La tráquea descclularizada contenía los tres tipos de COL observados en tráquea nativa. Véase la figura 56. Estos resultados sugieren que el tejido traqueal descclularizado soporta la adhesión, el crecimiento y la diferenciación de células epiteliales de las vías respiratorias *in vitro*.

5 Crecimiento de células epiteliales de las vías respiratorias sobre tejido traqueal descclularizado

Se diseñó el siguiente conjunto de experimentos para hacer crecer células sobre tejido descclularizado. En resumen, se cultivaron células epiteliales bronquiales/traqueales humanas (NHBE) en medio de crecimiento epitelial bronquial (BEGM). Se enjuagó extensamente (al menos 24 h) la tráquea descclularizada (incubación con tampón CHAPS 6 h) con PBS estéril. Se desprendió la capa de cartílago (así como la capa adventicia), dejando la capa submucosa y la mucosa de la tráquea para la posterior siembra de células. Se cortó el tejido hasta aproximadamente 5 x 5 cm² de tamaño y se puso sobre un inserto Transwell (0,4 µm de tamaño de poro) en una placa de 6 pocillos, con la superficie epitelial hacia arriba.

Se sembraron las células sobre tejido traqueal descclularizado de la siguiente manera. Se añadieron 50 µl de células (a 3,5 x 10⁶ células/ml) a la superficie epitelial del tejido traqueal descclularizado y se incubó durante 30 min a 37°C. Entonces se añadieron nuevos medios de cultivo a ambos lados superior e inferior del inserto Transwell, y se incubaron las células durante un tiempo adicional. En el tiempo indicado, se retiraron los cultivos del inserto Transwell y se fijaron con formalina al 10%. Se tiñeron secciones incrustadas en parafina de 5 µm con H&E. Se observó que la tráquea descclularizada soportaba la adhesión y el crecimiento de NHBE. Véase la figura 57.

Se diseñó el siguiente conjunto de experimentos para hacer crecer células epiteliales de las vías respiratorias pequeñas humanas (SAEC) que se transfectaron con un transgén sobre tejido descclularizado.

En resumen, se transfectaron SAEC humanas con retrovirus de GFP durante 6 h. Se sembraron las células sobre tejido traqueal descclularizado en placas de 6 pocillos de la siguiente manera. Se añadieron 50 µl de células (a 5 x 10⁶ células/ml) a la superficie epitelial del tejido traqueal descclularizado (aproximadamente 0,5 x 1,0 cm²) y se incubó durante 30 min a 37°C. Entonces se añadieron nuevos medios de cultivo y se incubaron las células durante un tiempo adicional. Se observó que la tráquea descclularizada también soportaba la adhesión y el crecimiento de SAEC. Véase la figura 58. Además, la tráquea descclularizada soportaba la adhesión y el crecimiento de SAEC que se habían transfectado con GFP, como prueba de principio del cultivo de células epiteliales pulmonares humanas que se han transfectado con un gene de interés.

Terapia génica de células epiteliales de las vías respiratorias

Se diseñó el siguiente conjunto de experimentos para determinar la factibilidad de usar el tejido descclularizado para terapia génica para células de pulmón. Se realizó la modificación genética de la siguiente manera. Se preparó sobrenadante de retrovirus de EGFP (GFP mejorada) usando la línea celular de empaquetamiento Phoenix. Se insertó ADN de EGFP en el vector LZRSpBMN. Se hicieron crecer NHBE y SAEC hasta que fueron confluentes en más del 80%. El día de la infección, se enjuagaron las células unas cuantas veces y se inocularon con el sobrenadante del virus (que contenía Polybrene 8 µg/ml) durante 6 h a 37°C. Se enjuagaron las células unas cuantas veces y se incubaron en medios nuevos durante la noche. Entonces se analizaron las células para determinar GFP usando citometría de flujo. Se observó que las células infectadas se tiñeron de manera positiva para GFP. Por ejemplo, las células NHBE mostraron una tinción positiva del 18,5% para GFP en comparación con células no infectadas. Las células SAEC mostraron una tinción positiva del 16% para GFP en comparación con células no infectadas. Los resultados presentados en el presente documento demuestran la capacidad para infectar células epiteliales pulmonares humanas con un gen de interés en este sistema de cultivo, usando un retrovirus. Sin embargo, también están abarcados otros medios de inserción de un transgén en la invención. Por ejemplo, se diseñó el siguiente conjunto de experimentos para someter a prueba la factibilidad de usar un sistema de lentivirus.

Se realizó la infección con lentivirus de GFP de la siguiente manera. Se preparó sobrenadante de lentivirus de EGFP en células 293T en medio libre de suero. Se insertó ADN de GFP en el vector pSicoR con promotor de CMV. Se sembraron NHBE sobre una placa de 6 pocillos a 1 x 10⁵ células/pocillo y se incubaron a 37°C durante 1 día (confluentes al 80 -90%). El día de la infección, se enjuagaron las células unas cuantas veces y luego se inocularon con el sobrenadante del virus (diluido 1:3 con BEGM nuevo) (que contenía Polybrene 8 µg/ml) durante 6 h a 37°C. Se enjuagaron las células unas cuantas veces y luego se incubaron con medios nuevos durante 2 días adicionales. Se fijaron las células con paraformaldehído al 4% durante 30 min y se examinaron al microscopio. Véase la figura 59. Se resumen los resultados en la tabla 2:

Tabla 2:

| Muestras | Células totales | Células GFP+ | % de infección |
|----------|-------------------------|-------------------------|----------------|
| Control | 0,996 x 10 ⁶ | 0 | |
| 6 h | 1,190 x 10 ⁶ | 0,635 x 10 ⁶ | 52,7 |

| | | | |
|-------------|-------------------------|-------------------------|------|
| 20 h | 0,972 x 10 ⁶ | 0,638 x 10 ⁶ | 64,9 |
| 6 h + 6 h | 0,727 x 10 ⁶ | 0,389 x 10 ⁶ | 53,6 |
| 20 h + 20 h | 0,420 x 10 ⁶ | 4564 | 10,7 |

Los resultados presentados en el presente documento demuestran que NHBE infectadas con lentivirus de GFP no mostraron el cambio de morfología obvio después de 6 h. La infección una vez durante 6 h produjo más del 50% de células positivas para GFP evaluado mediante citometría de flujo. La eficiencia de infección para SABC también pareció ser de más del 50%. Los resultados presentados en el presente documento demuestran que puede usarse cualquier gene deseado para generar células de pulmón modificadas genéticamente.

Inyección de células epiteliales de las vías respiratorias en pulmones de ratón.

Se diseñaron los siguientes experimentos para determinar la factibilidad de inyectar células epiteliales de las vías respiratorias en un pulmón de mamífero. En resumen, se inyectaron 100 µl de una mezcla 1:1 de microesferas de 5 µm y PBS a través de la tráquea en un ratón C57BL/6J hembra, de ~ 10 semanas de edad (Jackson Lab). El ratón sobrevivió durante unos cuantos minutos después de la inyección. Se extrajo el pulmón inmediatamente y se fijó con formalina. Se tiñeron secciones incrustadas en parafina de 5 µm con H&E. Se realizó este estudio como estudio de factibilidad inicial para determinar si partículas de tamaño celular que se administraban mediante instilación en las vías respiratorias se detectarían dentro de los pulmones de mamíferos. Los resultados de las imágenes de H&E de pulmón de ratón al que se le inyectaron microesferas demostraron que estaban presentes números significativos de microesferas en cada lóbulo del pulmón de ratón. Véase la figura 60. Los resultados demuestran que la inyección usando el enfoque traqueal funciona para la instilación de células.

El siguiente conjunto de experimentos incluyó inyectar células marcadas con GFP en pulmones de ratón explantados. En resumen, se infectaron células con retrovirus de GFP con 6 h. Se sacrificaron ratones C57BL/6J, se expuso la tráquea y se ató el extremo proximal con sutura. Se inyectaron 100 µl de SAEC infectadas con retrovirus de GFP a través de la tráquea (seguido por 200 µl de aire para empujar las células) al interior de los pulmones de ratones. Se ató el extremo distal de la tráquea. Se explantó el pulmón y se fijó inmediatamente con formalina al 10%. Se desparafinizaron las secciones incrustadas en parafina de 5 µm, se rehidrataron, se recuperó el antígeno (usando tampón ácido cítrico 10 mM, pH 6), se permeabilizaron (con Triton X) y se bloquearon. Se aplicó anticuerpo anti-GFP policlonal de conejo (de Abcam) a las secciones, seguido por IgG de cabra anti-conejo conjugada con Alexa Fluor 555. Se contratiñeron los cortes con DAPI. Se observó que se encontraban células positivas para GFP en los pulmones explantados. Véase la figura 61. Los resultados presentados en el presente documento demuestran la inyección satisfactoria de células en los pulmones, y que células epiteliales humanas que se han transducido con un transgén (GFP) se adherían a epitelio de pulmón.

Se diseñó el siguiente conjunto de experimentos para determinar la factibilidad de inyectar células marcadas con GFP en pulmones de ratón. En resumen, se anestesiaron ratones (C57BL/6J, hembra, ~ 10 semanas de edad) y se expuso la tráquea. Se inyectaron 100 µl de células epiteliales de las vías respiratorias humanas infectadas con retrovirus de GFP a través de la tráquea (seguido por 200 µl de aire) al interior de los pulmones. Véase la figura 62. Se permitió que se recuperasen los ratones durante de 6 h a 3 días. El día de la extracción, se perfundió el pulmón con PBS a través de arteria pulmonar para retirar la sangre, y luego se perfundió con formalina al 10% a través de la tráquea, y se diseccionó. Se fijó el pulmón extraído en formalina durante otras 4 h. Se tiñeron secciones incrustadas en parafina de 5 µm para GFP tal como se comenta en otra parte del presente documento. Se observó que se encontraban células epiteliales de las vías respiratorias humanas positivas para GFP positive (tanto NHBE como SABC) en pulmones de ratón durante días después de la instilación en las vías respiratorias. Véase la figura 63. Esto muestra que pueden administrarse células epiteliales humanas, que se han hecho crecer en cultivo y se han transducido con un transgén de interés, a los pulmones de un mamífero receptor, y adherirse al pulmón del receptor y sobrevivir y proliferar.

Ejemplo 7: Implantación de pulmón creado por ingeniería descelularizado

Se diseñó este experimento para mostrar la factibilidad de implantar un pulmón creado por ingeniería, descelularizado en un receptor de rata viva. Se preparó un pulmón de rata creado por ingeniería descelularizado según los ejemplos. Se anestesió una rata de laboratorio macho adulta con inyección intraperitoneal de ketamina y xilazina. Entonces se intubó la rata por vía traqueal y se ventiló con oxígeno al 100% mezclado con Forane para mantener la anestesia. En condiciones estériles, se abrió el tórax mediante esternotomía media. Se retrajeron las costillas bilateralmente, dejando al descubierto pulmones con insuflación y el corazón latiendo normalmente. Tras heparinización sistémica, se extirpó el pulmón izquierdo nativo *in toto*. Luego, se sometió a anastomosis el pulmón creado por ingeniería descelularizado con la arteria pulmonar, vena pulmonar y bronquio principal izquierdo del receptor usando sutura 10-0 bajo un microscopio de operación.

Tras la retirada de las pinzas vasculares sobre la arteria y vena pulmonar, se observó que perfundía sangre por el pulmón creado por ingeniería de modo normal. Además, el pulmón creado por ingeniería implantado se ventilaba fácilmente y se sometía a ciclos de insuflación y desinflamamiento de manera similar al pulmón derecho nativo

5 residente. La figura 64 muestra fotografías del pulmón creado por ingeniería implantado en insuflación y desinflamiento durante el ciclo ventilatorio. Así, los pulmones creados por ingeniería producidos usando las técnicas del presente documento son tanto implantables en un mamífero, como son funcionales desde el punto de vista de permitir la perfusión a través del órgano completo, y una fácil ventilación de las vías respiratorias. Durante todo el periodo de implantación, no hubo evidencias de hemorragia o fuga de aire del pulmón creado por ingeniería implantado.

REIVINDICACIONES

1. Tejido de pulmón descelularizado que puede soportar el crecimiento celular, en el que el tejido de pulmón descelularizado presenta una característica de un tejido natural correspondiente antes de la descelularización, en el que el tejido de pulmón descelularizado presenta propiedades mecánicas sustancialmente similares a las de dicho tejido natural correspondiente y en el que el tejido de pulmón descelularizado se produce usando una disolución de descelularización que comprende una disolución hipertónica, un detergente y un agente quelante.
2. Tejido descelularizado según la reivindicación 1, en el que el tejido descelularizado presenta una morfología sustancialmente similar a la de un tejido por lo demás idéntico antes de la descelularización.
3. Tejido descelularizado según la reivindicación 1, que conserva una matriz extracelular de dicho tejido natural correspondiente, en el que dicha matriz extracelular comprende una superficie exterior, y en el que dicha superficie exterior está sustancialmente intacta.
4. Tejido descelularizado según la reivindicación 1, en el que se han eliminado sustancialmente los marcadores inmunogénicos.
5. Composición que comprende tejido descelularizado según la reivindicación 1, en la que dicho tejido descelularizado es un armazón tridimensional.
6. Método de preparación de un tejido de pulmón tridimensional creado por ingeniería que puede soportar y mantener el estado de diferenciación de una célula de pulmón, comprendiendo dicho método sembrar un armazón de pulmón descelularizado con una población de células de pulmón para producir un armazón de pulmón sembrado, en el que el armazón de pulmón descelularizado se produce usando una disolución de descelularización que comprende una disolución hipertónica, un detergente y un agente quelante.
7. Método según la reivindicación 6, en el que dicho armazón descelularizado presenta una red vascular y un árbol respiratorio intactos.
8. Método según la reivindicación 6, en el que dicha población comprende
 - una célula madre derivada del pulmón, incluyendo una célula madre pulmonar; o
 - células epiteliales y endoteliales; o
 en el que el método comprende células que presentan expresión génica asociada con la inducción de morfogénesis de ramificación.
9. Método según la reivindicación 6, en el que dichas células están modificadas genéticamente.
10. Método según la reivindicación 6, en el que dicho armazón descelularizado puede soportar y mantener el estado de diferenciación de una célula epitelial alveolar.
11. Método según la reivindicación 6, en el que dicho armazón comprende un material biocompatible seleccionado del grupo que consiste en fibronectina, laminina, colágeno, glicoproteína, trombospondina, elastina, fibrilina, mucopolisacárido, glicolípido, sulfato de heparina, sulfato de condroitina, sulfato de queratina, glucosaminoglucano, ácido hialurónico, proteoglicano, vitronectina, poli-D-lisina, polisacárido, y combinaciones de los mismos.
12. Método según la reivindicación 8, en el que dichas células están modificadas genéticamente para expresar el gen de CFTR.
13. Método según la reivindicación 6, en el que dicho tejido tridimensional creado por ingeniería presenta una característica de un tejido de pulmón, en el que dicha característica se selecciona del grupo que consiste en morfogénesis de ramificación, citodiferenciación epitelial del pulmón distal, crecimiento epitelial, desarrollo vascular, y combinaciones de los mismos.
14. Composición implantable que comprende el tejido de pulmón descelularizado según la reivindicación 1.
15. Composición según la reivindicación 14, que comprende una población de células, en la que dicha composición puede soportar y mantener el estado de diferenciación de una célula de pulmón.
16. Composición según la reivindicación 15, en la que dicha población comprende
 - una célula madre; o
 - células epiteliales y endoteliales.

17. Composición según la reivindicación 15, en la que dichas células están modificadas genéticamente.

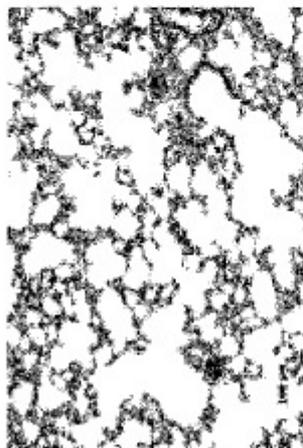
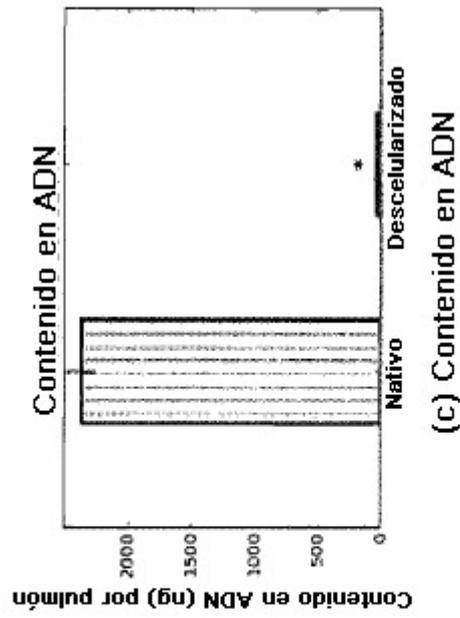


FIGURA 1

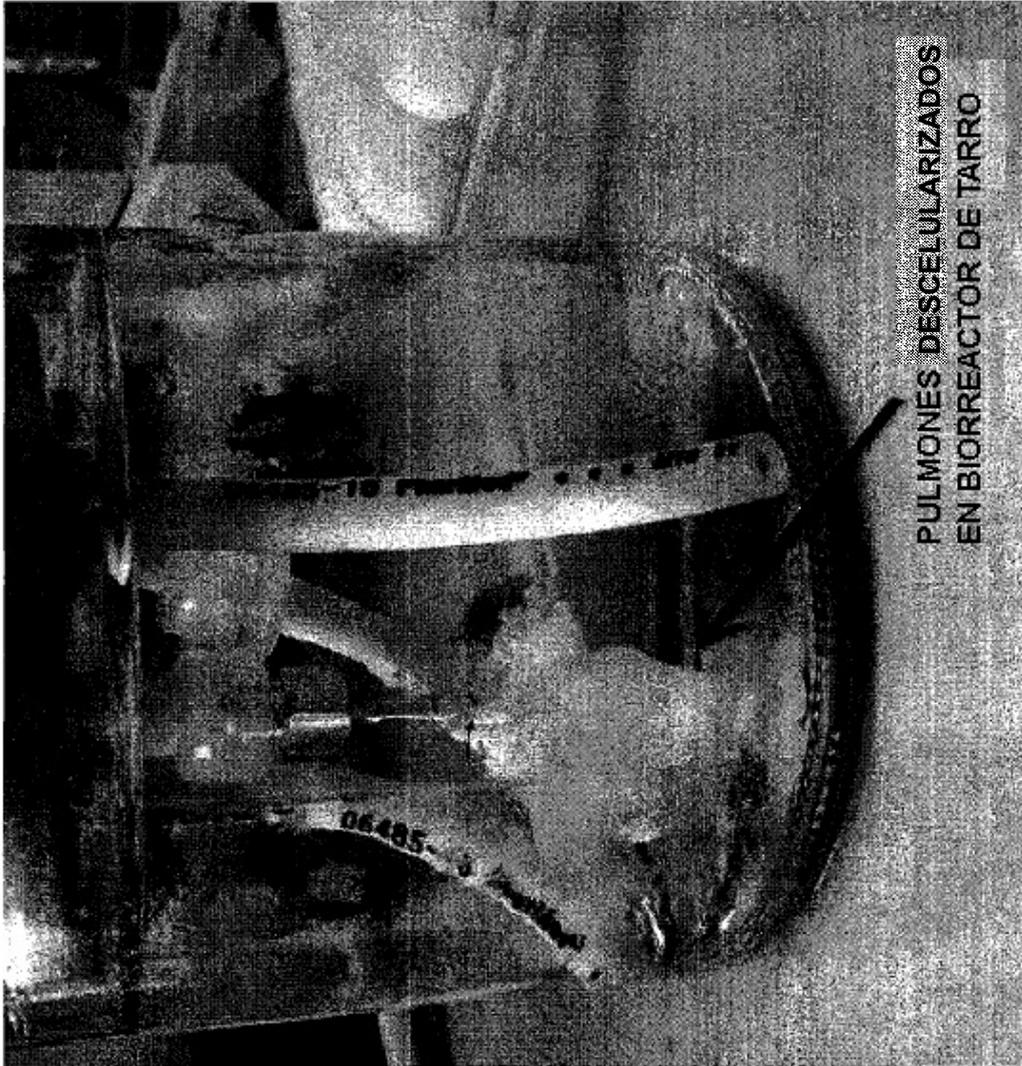
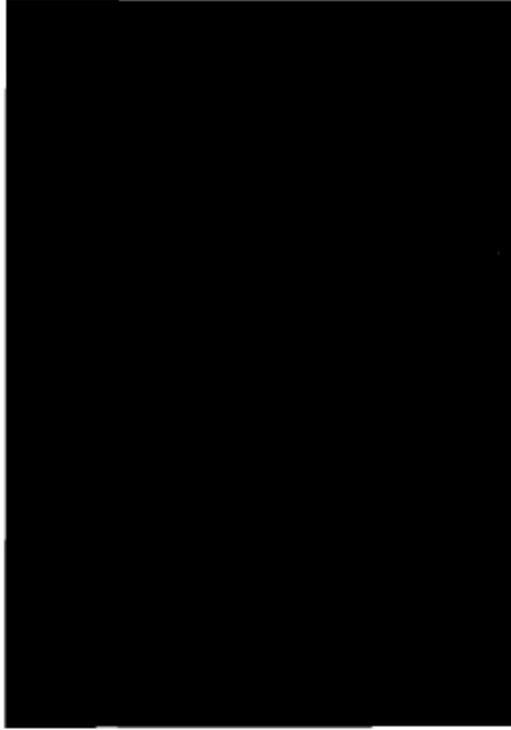
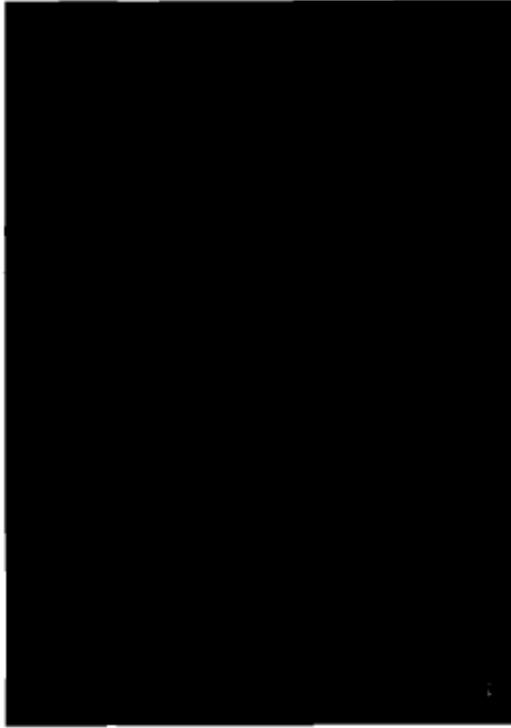


FIGURA 1D



(a) Pulmón nativo



(b) Pulmón descelularizado

FIGURA 2

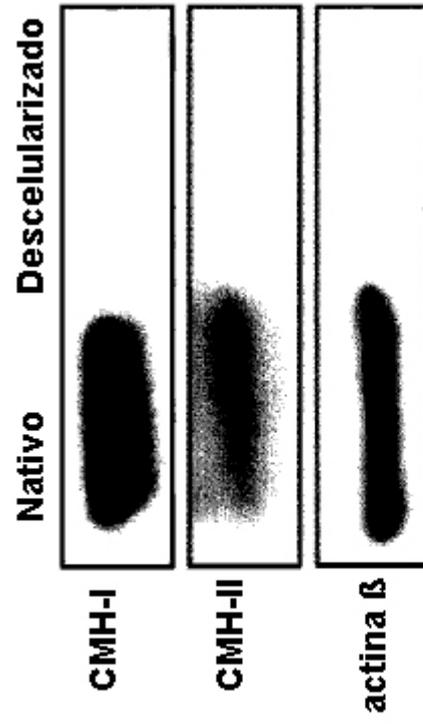
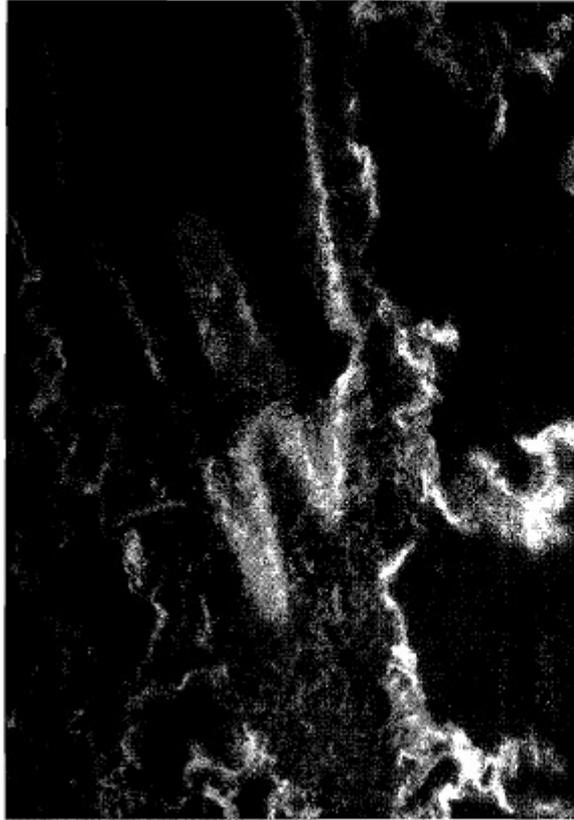
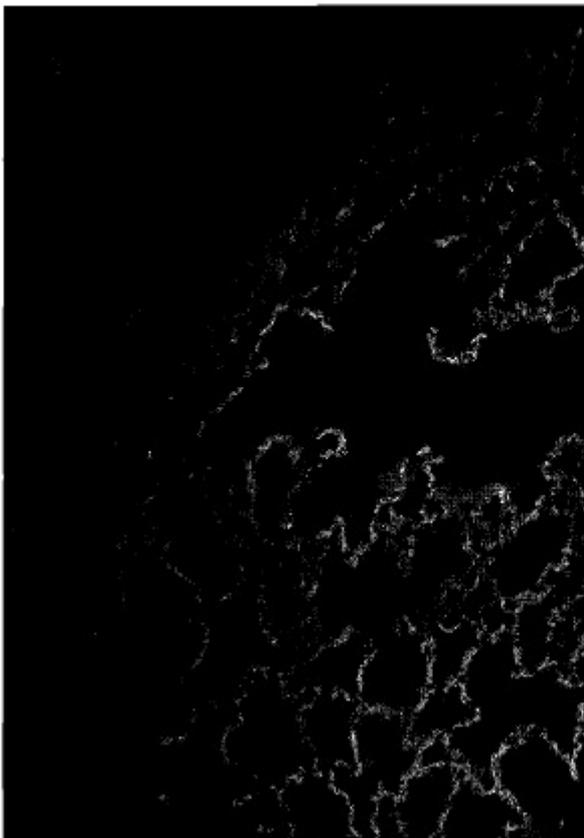


FIGURA 3

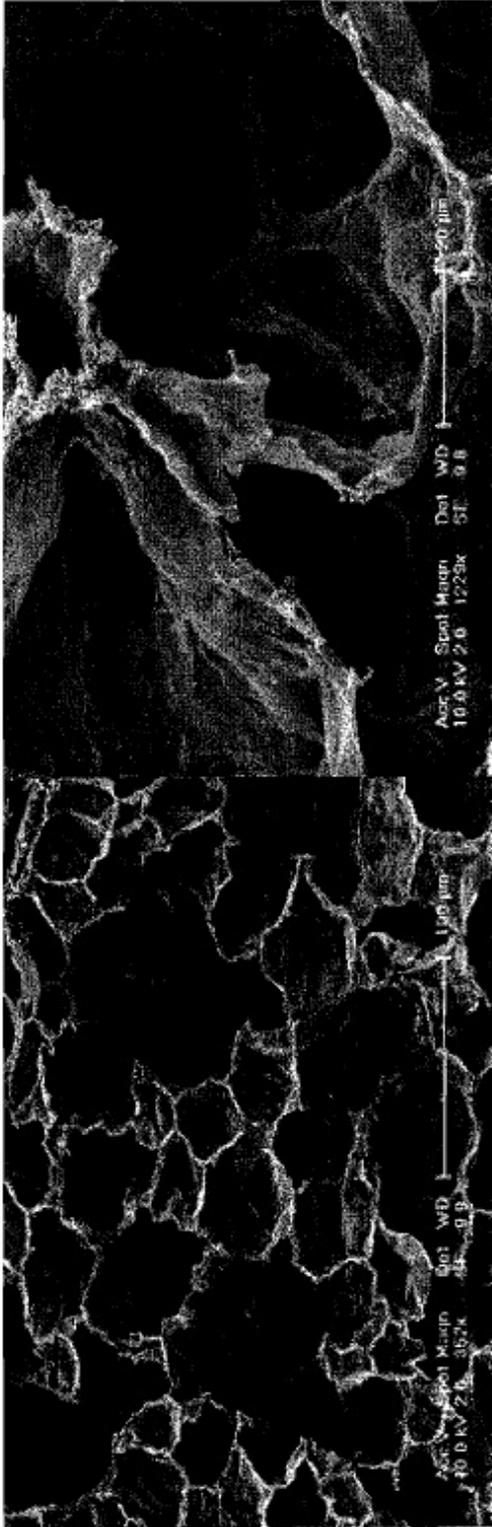


(b) Pulmón descelularizado

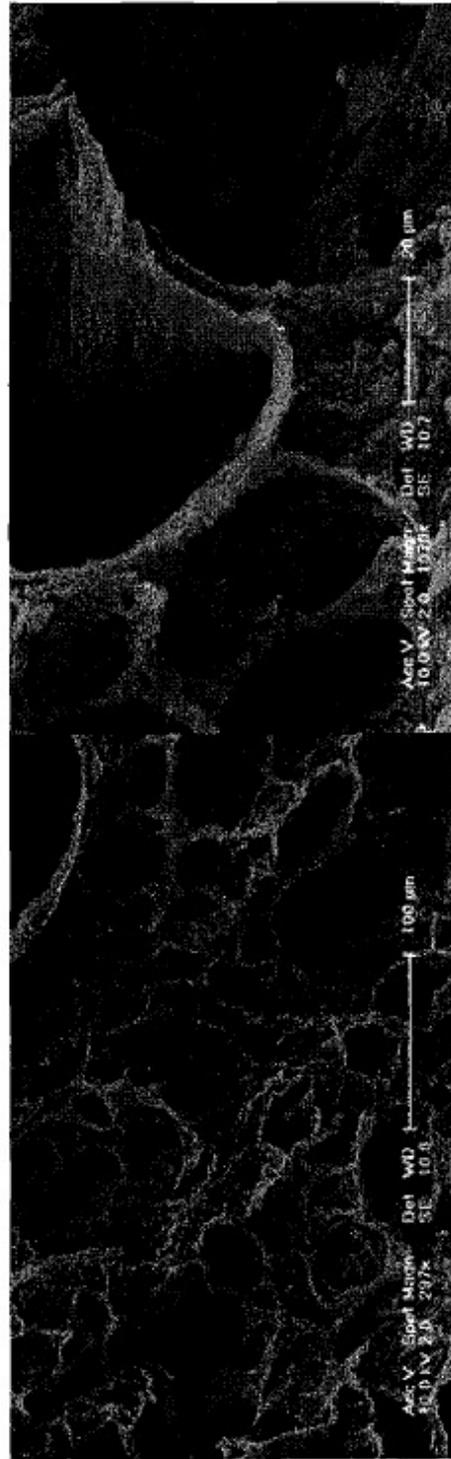


(a) Pulmón nativo

FIGURA 4



(a) Pulmón nativo



(b) Pulmón descelularizado

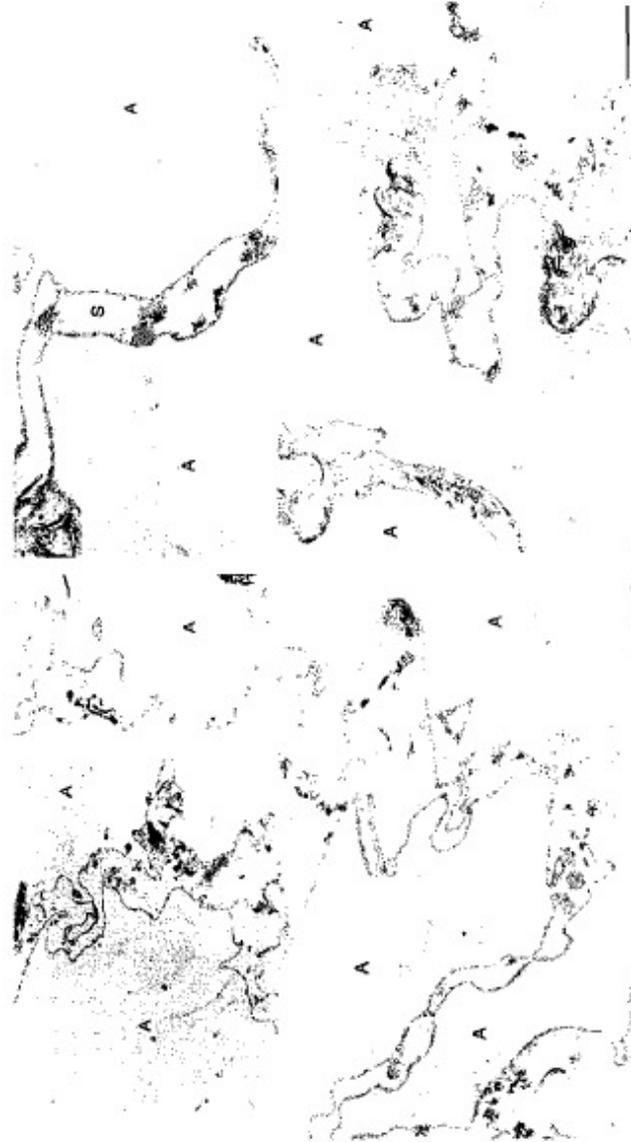
FIGURA 5



(a) Pulmón nativo



(b) Pulmón descelularizado dañado



(c) Pulmón descelularizado con membrana basal alveolar intacta

FIGURA 6

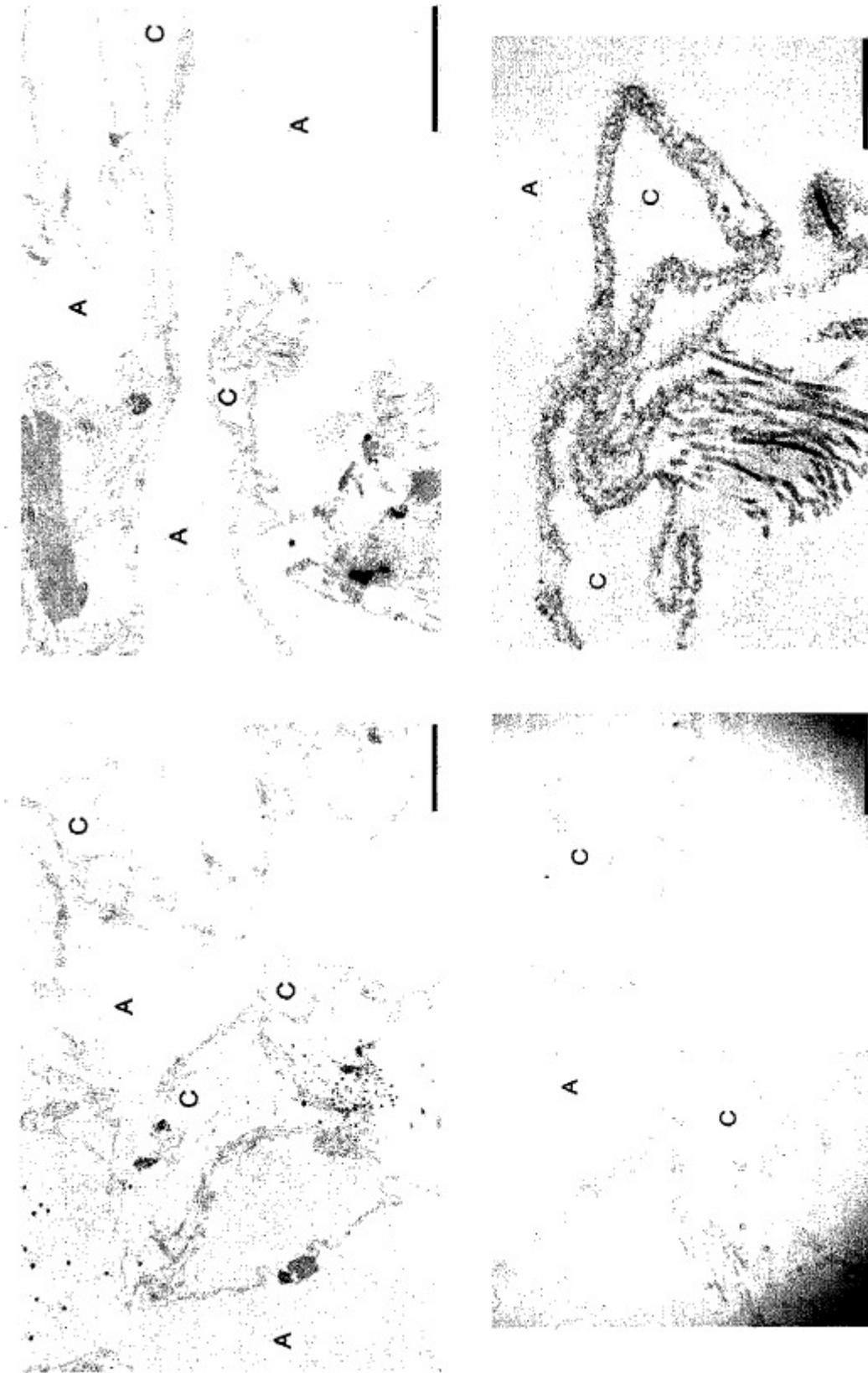


FIGURA 7

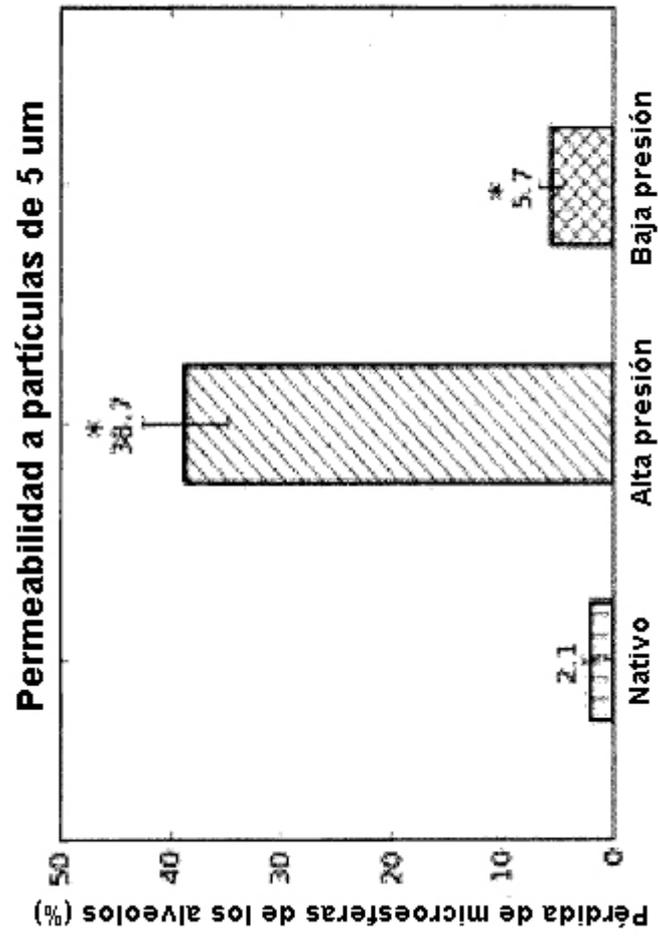
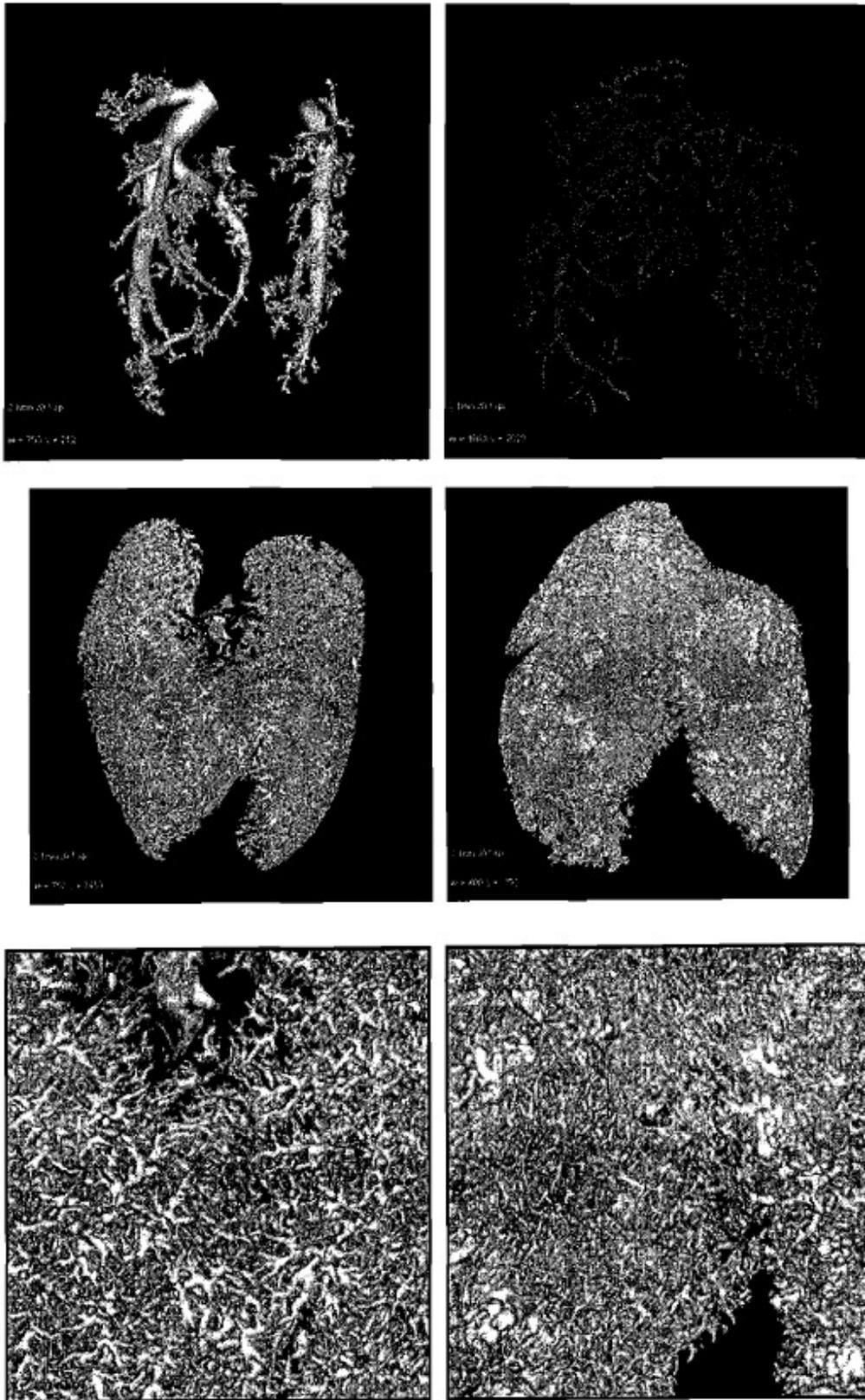


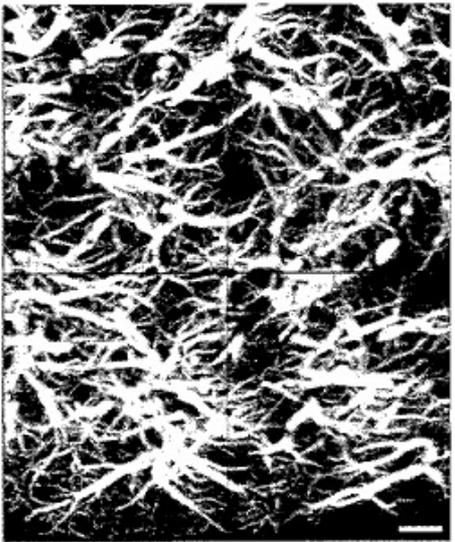
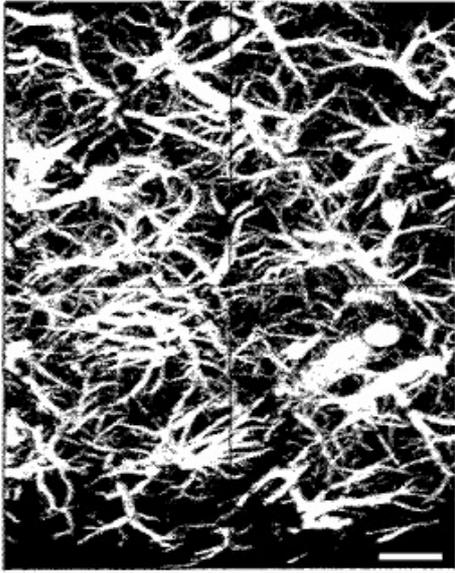
FIGURA 8



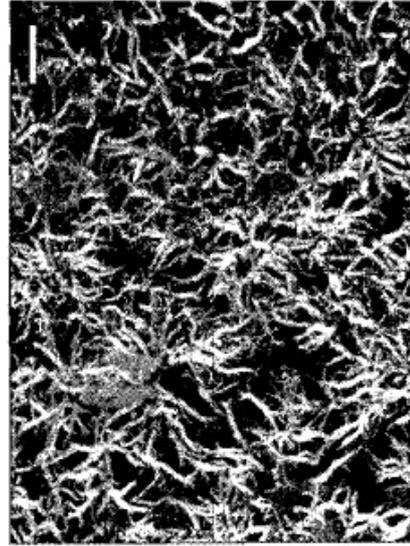
(a) Pulmón nativo

(b) Pulmón descelularizado

FIGURA 9



(a) Pulmón nativo



(b) Pulmón descelularizado

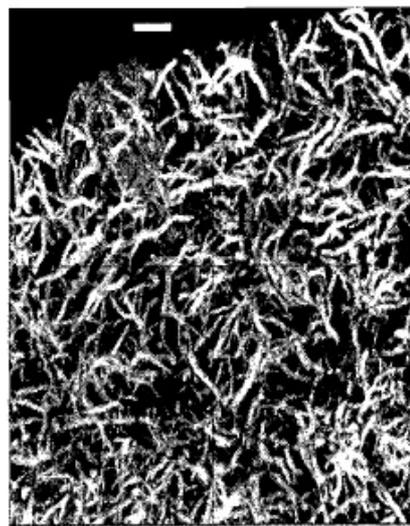


FIGURA 10

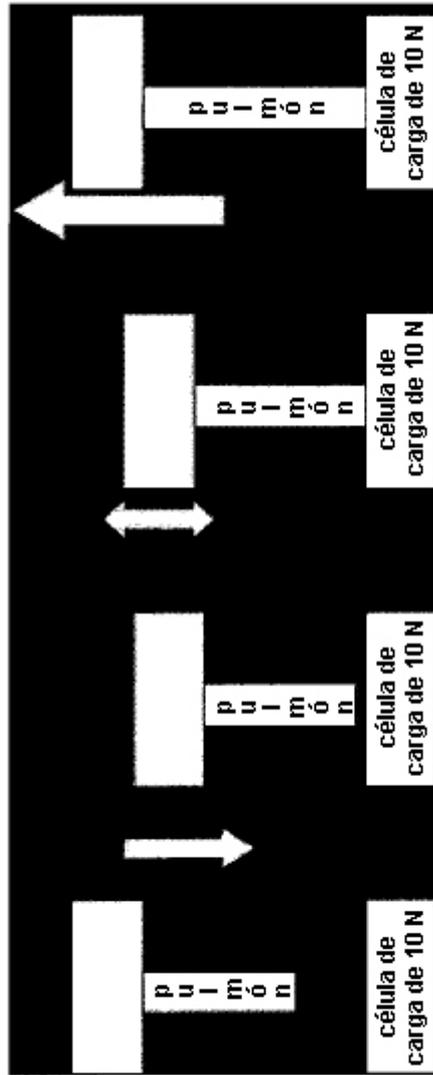
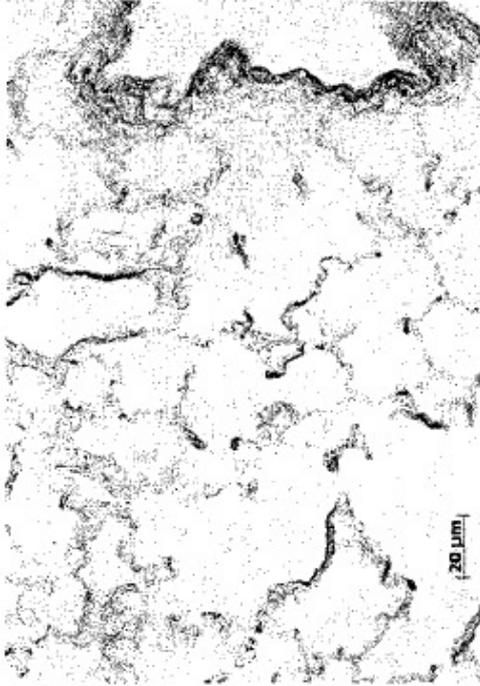
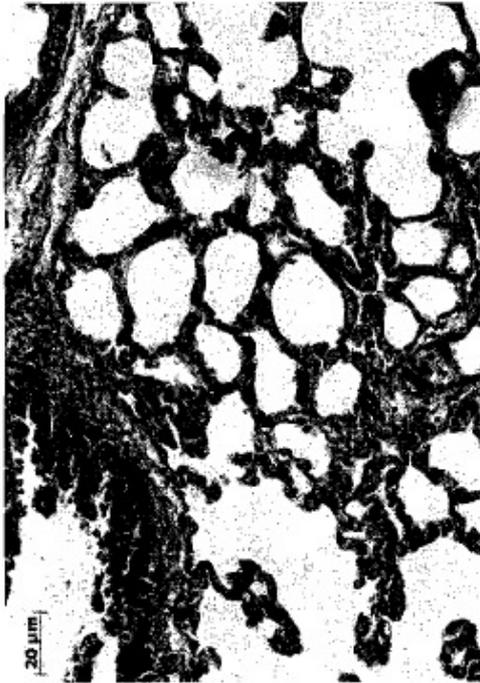


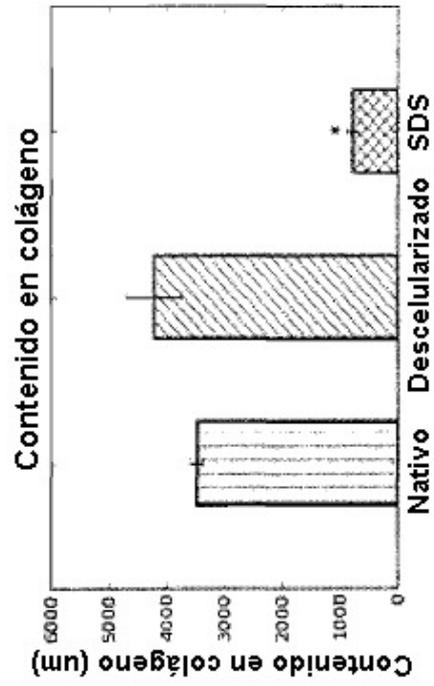
FIGURA 11



(b) Pulmón descelularizado

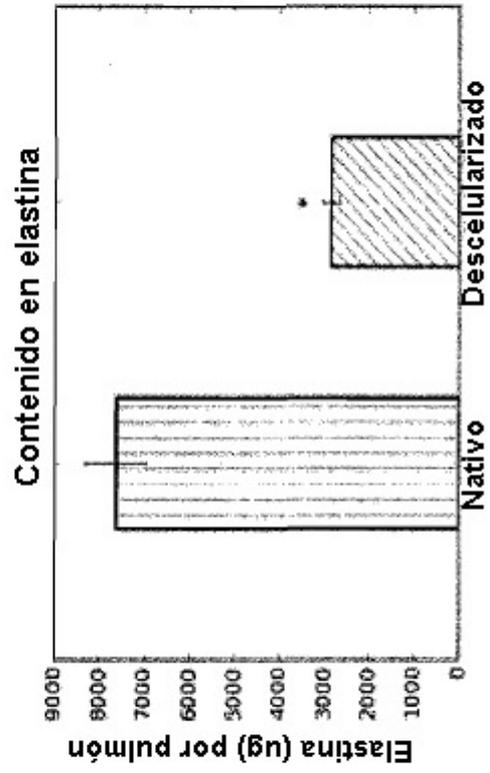
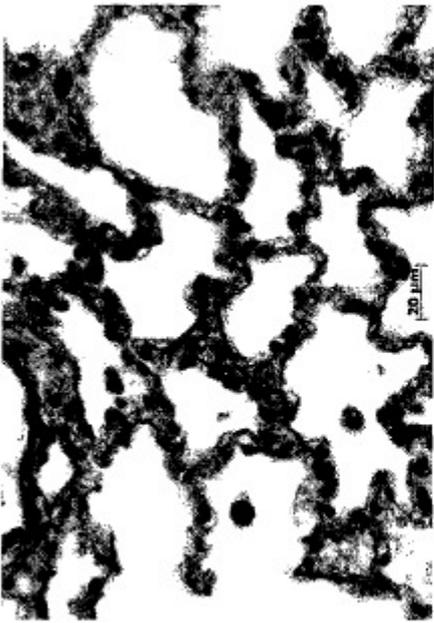
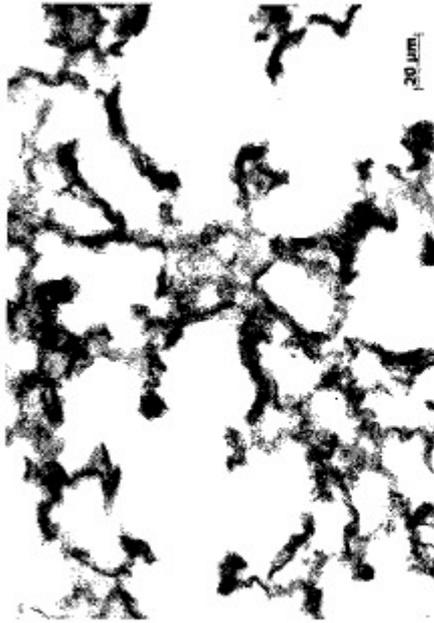


(a) Pulmón nativo



(c) Contenido en colágeno

FIGURA 12

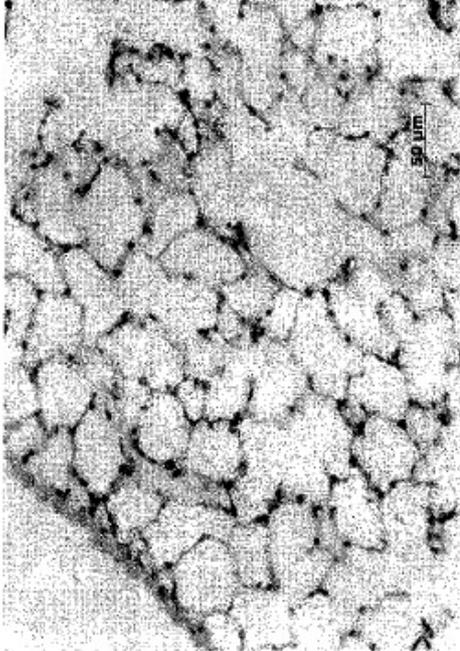


(c) Contenido en elastina

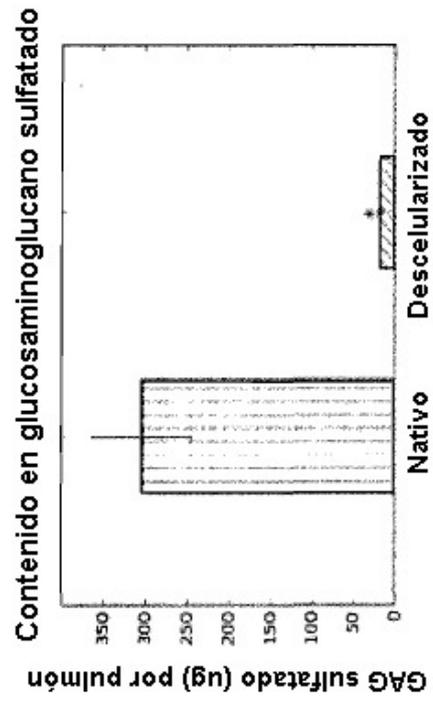
FIGURA 13



(b) Pulmón descelularizado



(a) Pulmón nativo



(c) Contenido en GAG

FIGURA 14

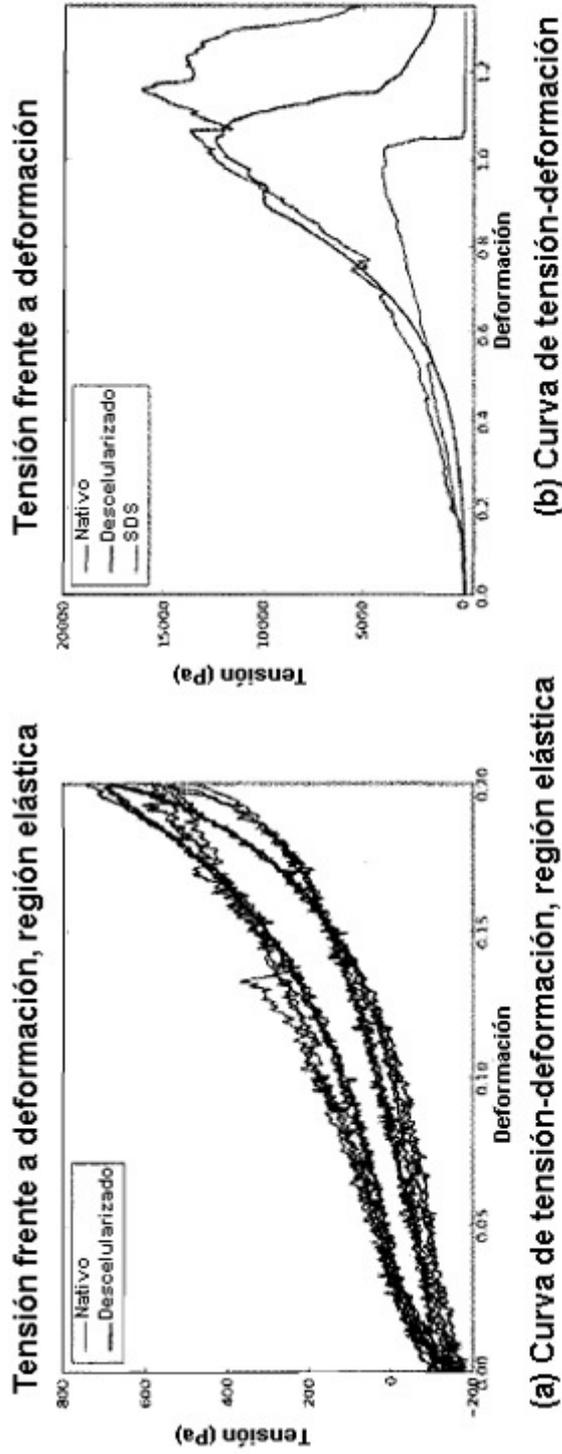


FIGURA 15

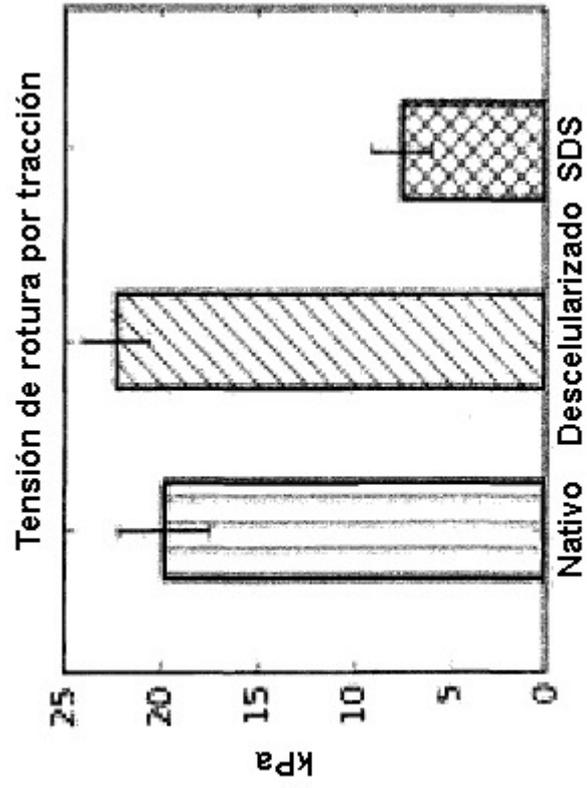
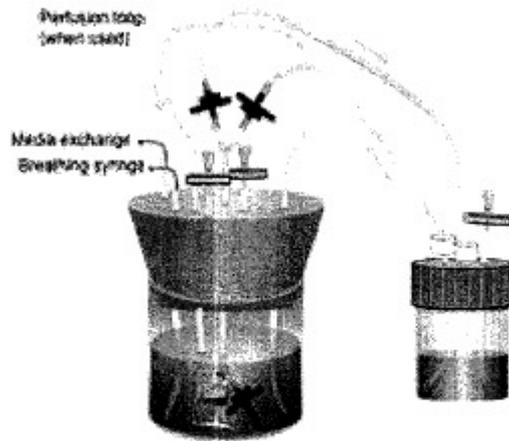
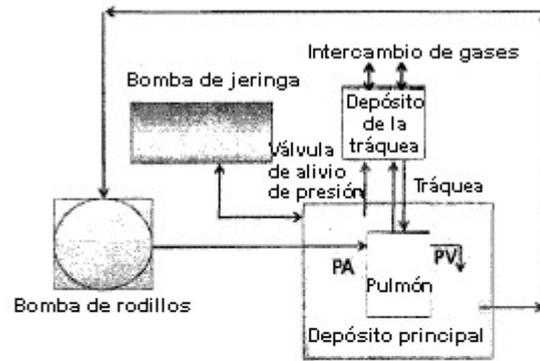


FIGURA 16

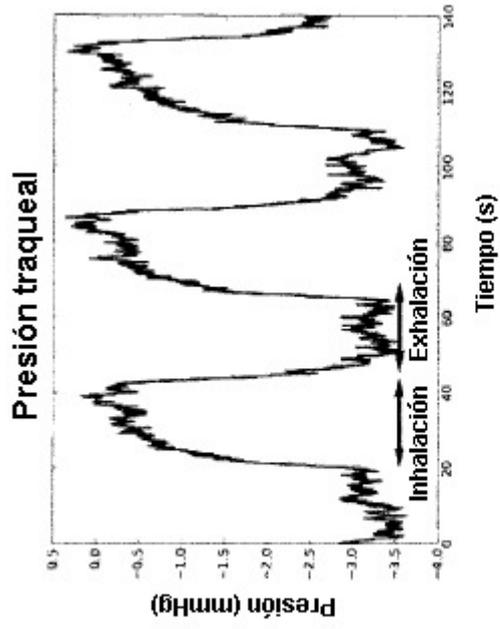


(a) Diagrama del biorreactor

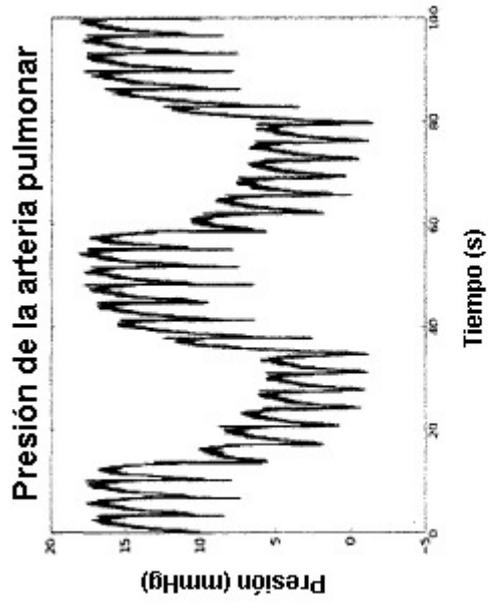


(b) Esquema del biorreactor

FIGURA 17

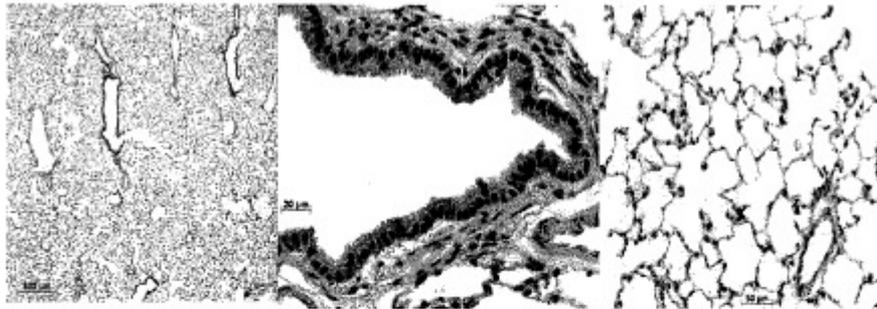


(b) Presión traqueal

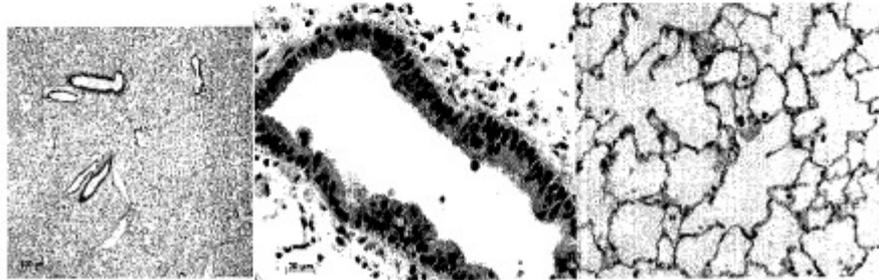


(a) Presión de la arteria pulmonar

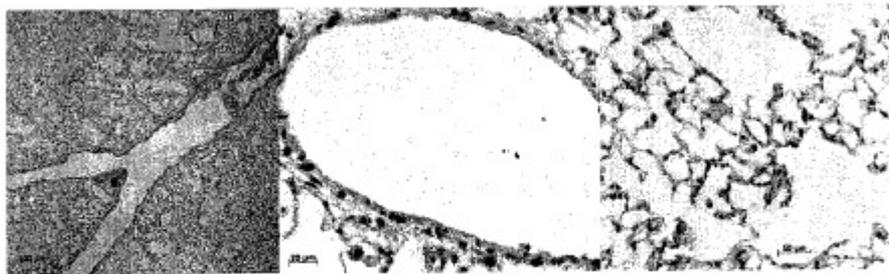
FIGURA 18



(a) Pulmón nativo



(b) Respiración de líquido



(c) Respiración de aire

FIGURA 19

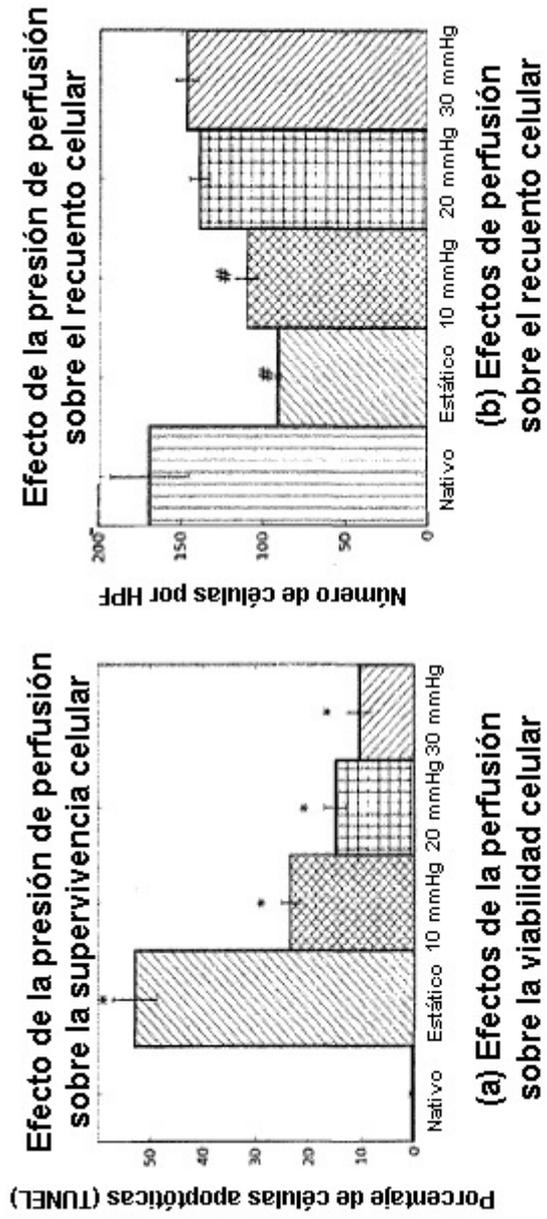
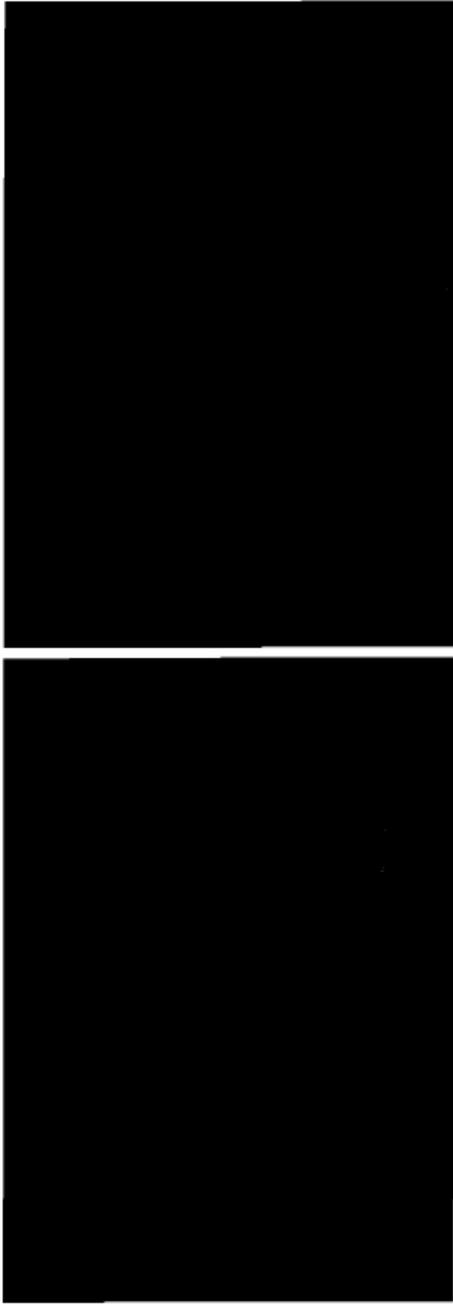
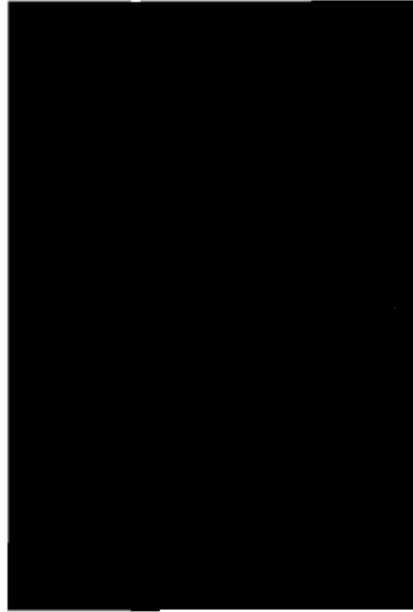


FIGURA 20



(a) CCSP, pulmón nativo

(b) CCSP, cultivo de pulmón perfundido



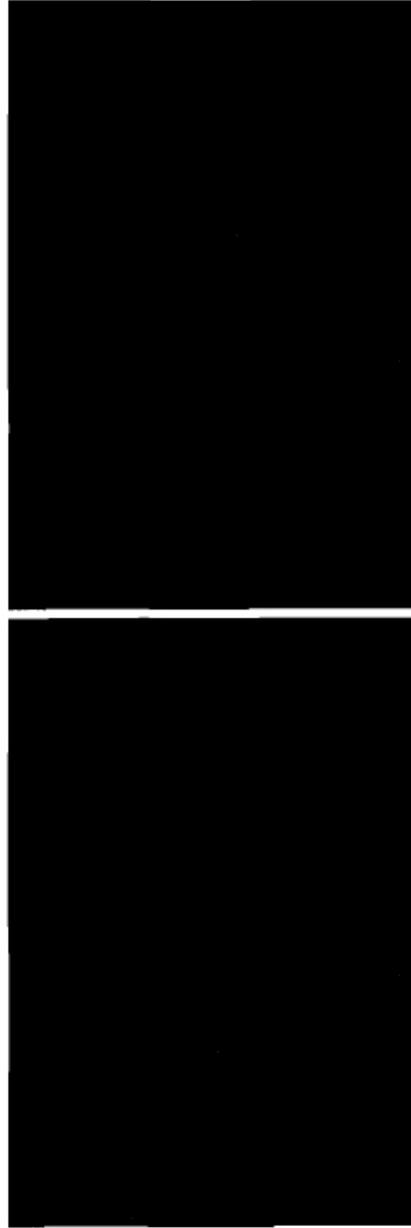
(c) SPC, pulmón nativo

(d) SPC, cultivo de pulmón perfundido

FIGURA 21



(a) PECAM, pulmón nativo



(b) PECAM, cultivo de pulmón perfundido

FIGURA 22

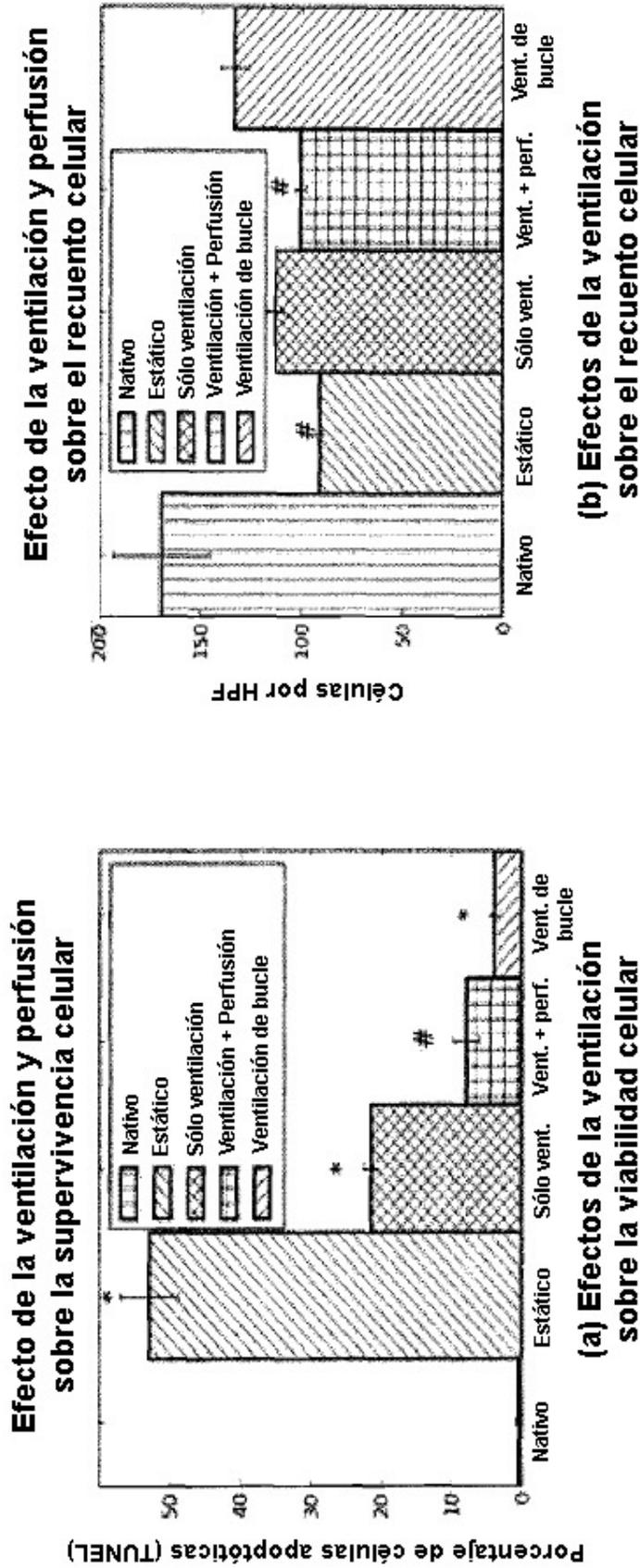


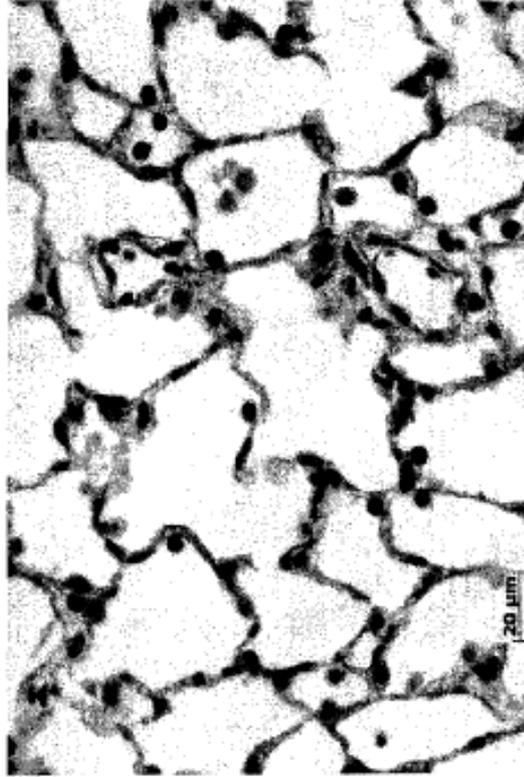
FIGURA 23



FIGURA 24



(a) Pulmón nativo

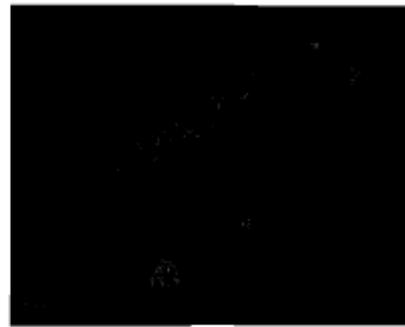


(b) Estructura alveolar a los 7 días

FIGURA 25



(c) Pulmón nativo: CCSP



(d) Pulmón cultivado: CCSP



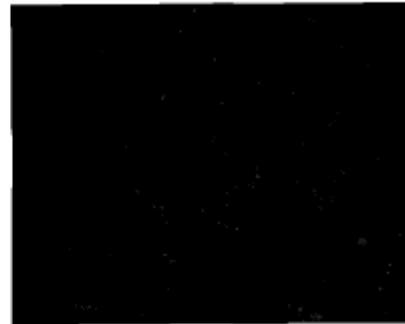
(e) Pulmón nativo: SPC



(f) Pulmón cultivado: SPC



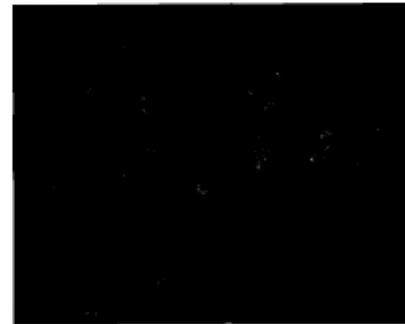
(g) Pulmón nativo: AQP



(h) Pulmón cultivado: AQP



(i) Pulmón nativo: PECAM



(j) Pulmón cultivado: PECAM

FIGURA 25

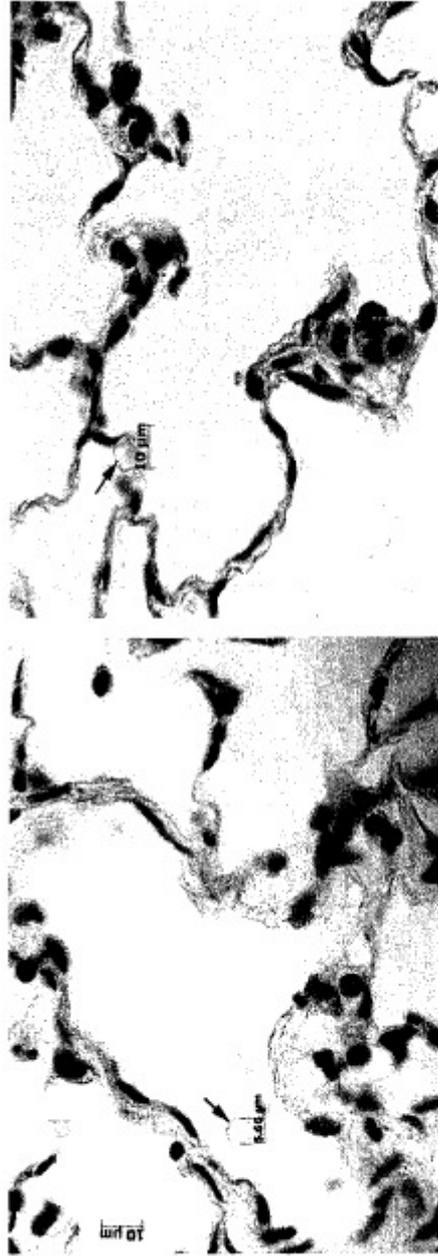
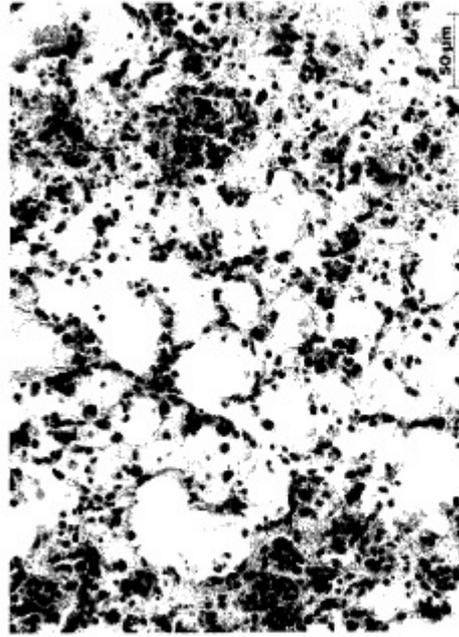
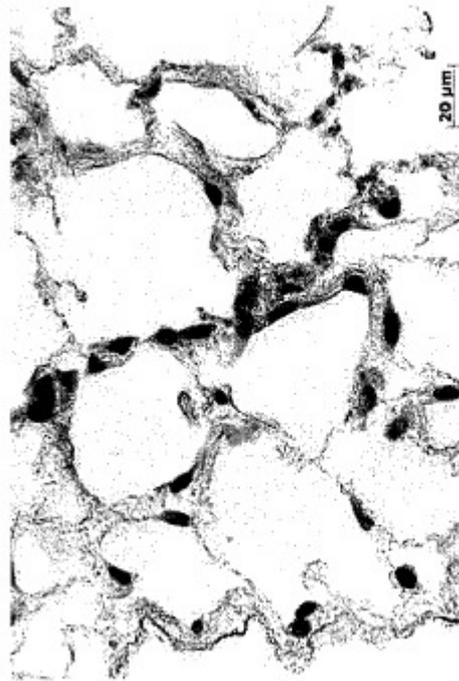


FIGURA 26

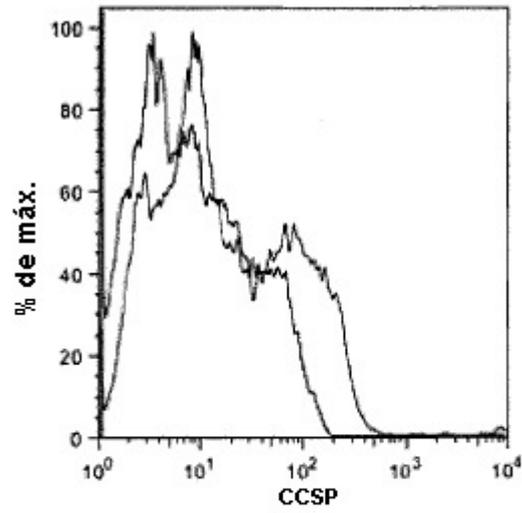


(b) 7 días

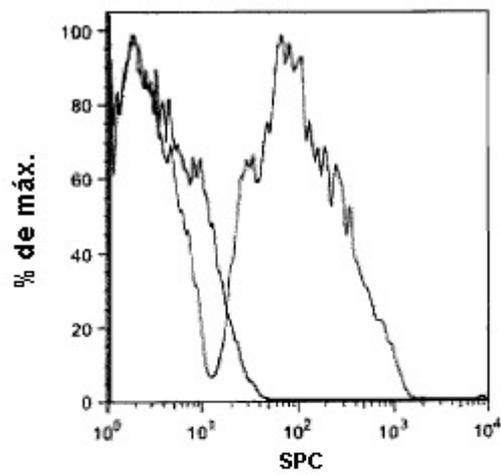


(a) 3 días

FIGURA 27

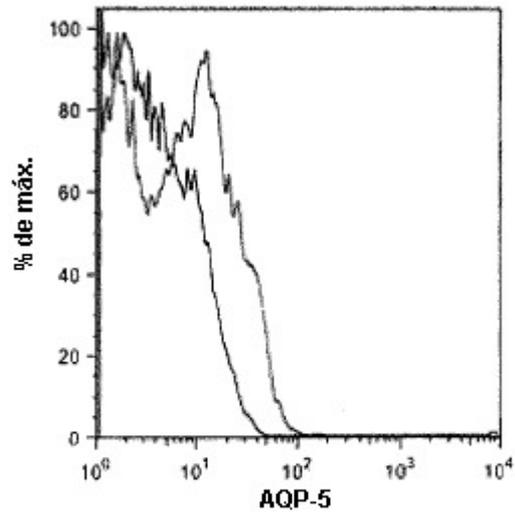


(a) Proteína secretora de células Clara

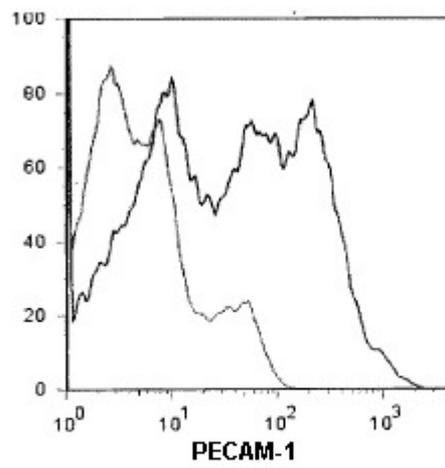


(b) Proteína C tensioactiva

FIGURA 28

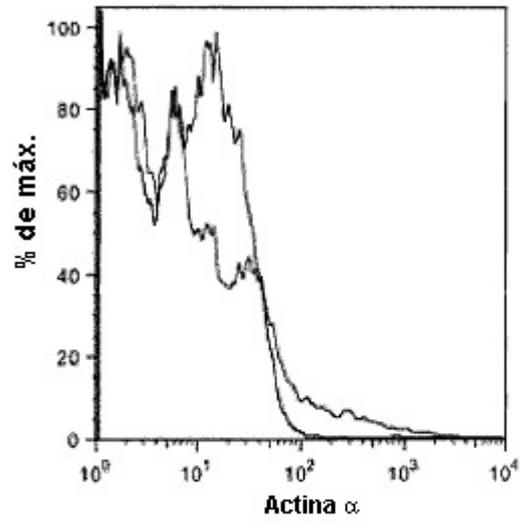


(c) Acuaporina-5

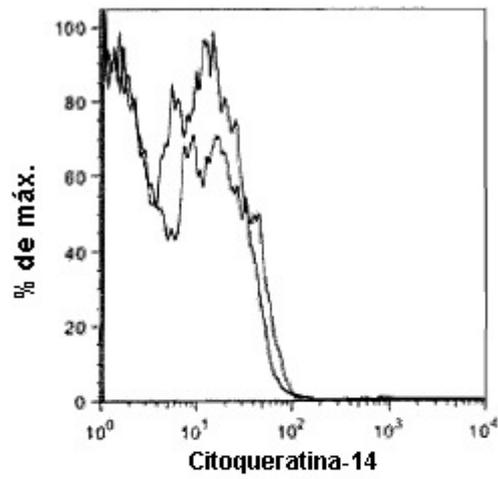


(d) PECAM-1

FIGURA 28



(e) Actina α



(f) Citoqueratina-14

FIGURA 28

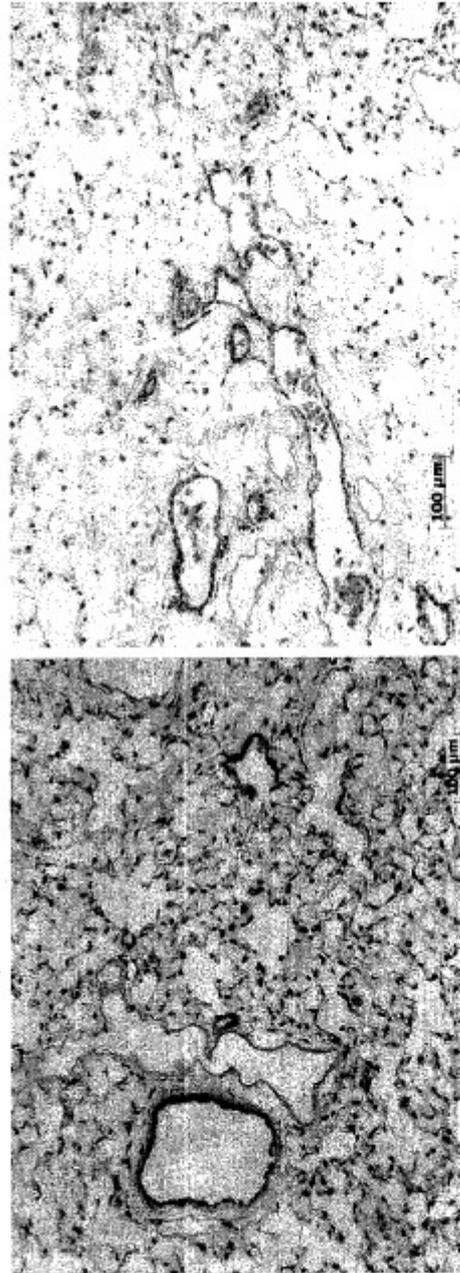
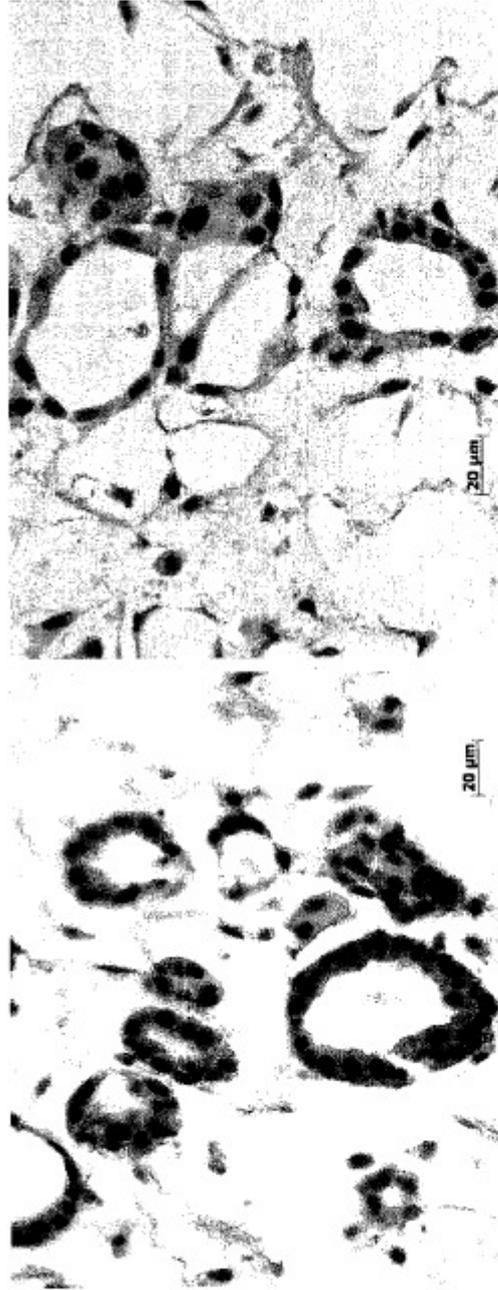


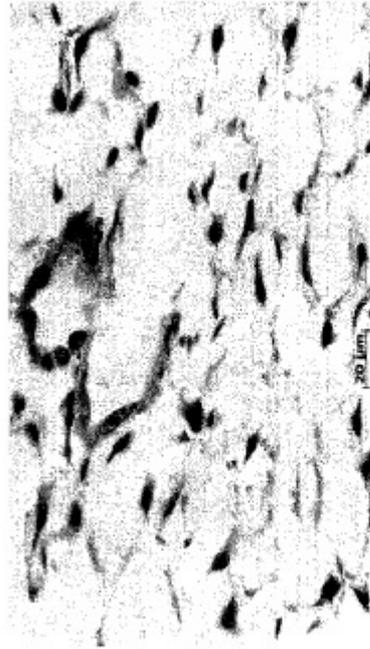
FIGURA 29



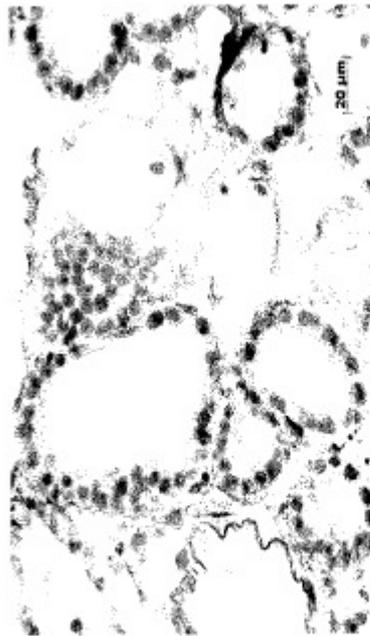
(a) Tinción de PCNA, 4 días

(b) Tinción de PCNA, 8 días

FIGURA 30



(b) Tinción TUNEL, 8 días



(a) Tinción TUNEL, 4 días

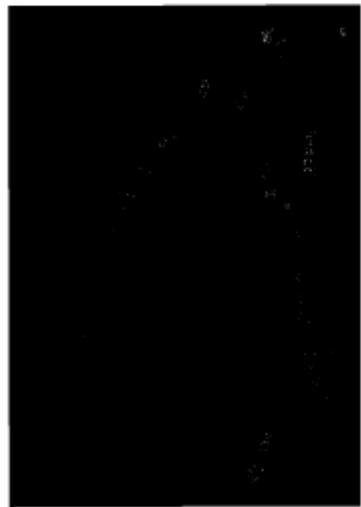
FIGURA 31



(a) Nativo



(b) Pulmón creado por ingeniería, 4 días



(c) Pulmón creado por ingeniería, 8 días

FIGURA 32

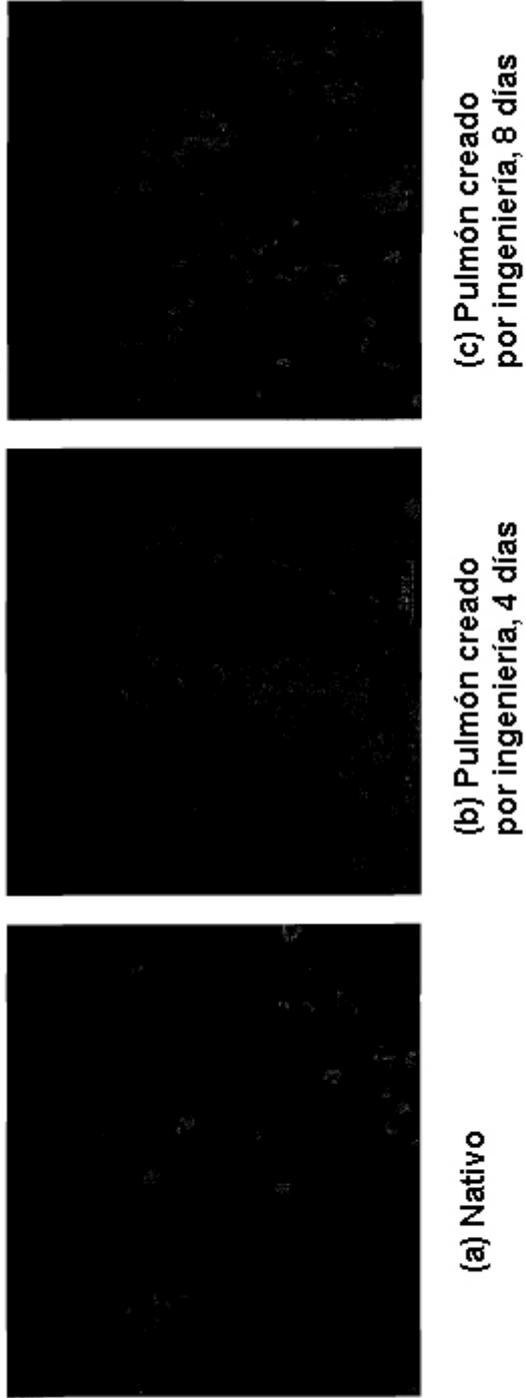


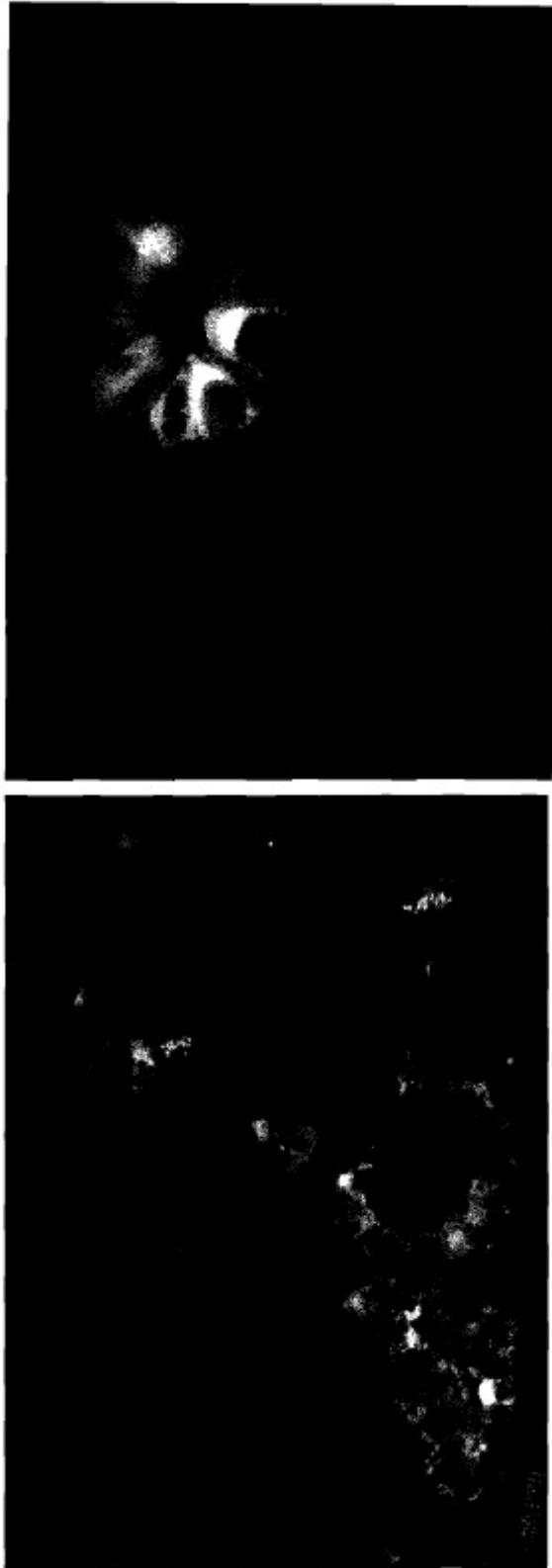
FIGURA 33



(a) Nativo

(b) Pulmón creado por ingeniería, 4 días

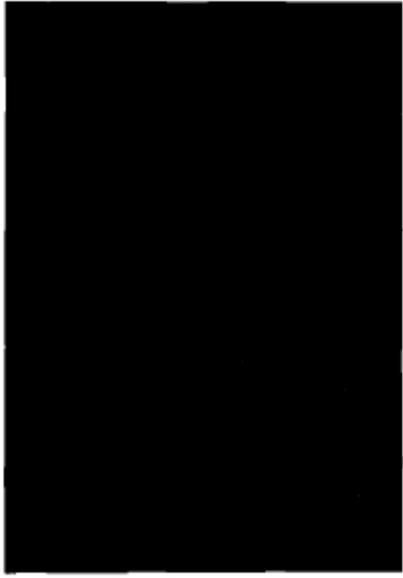
FIGURA 34



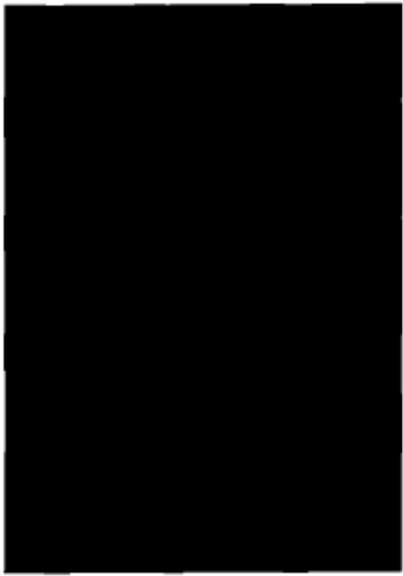
(b)

(a)

FIGURA 35



(a) Pulmón nativo



(b) Pulmón creado por ingeniería



(c) Pulmón creado por ingeniería

FIGURA 36

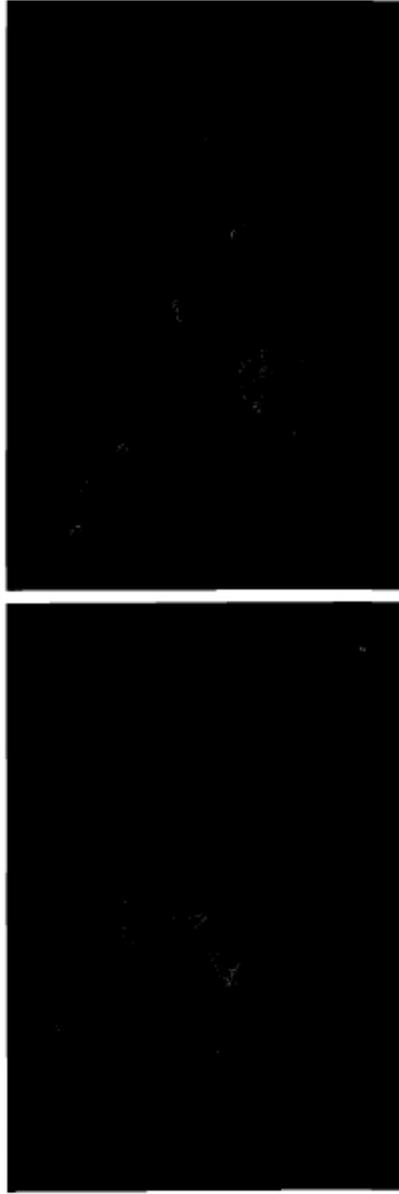
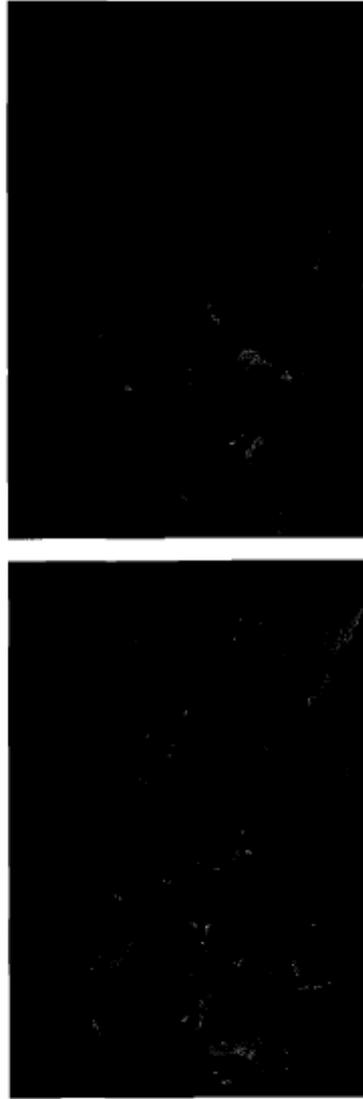


FIGURA 37



(a) Pulmón nativo



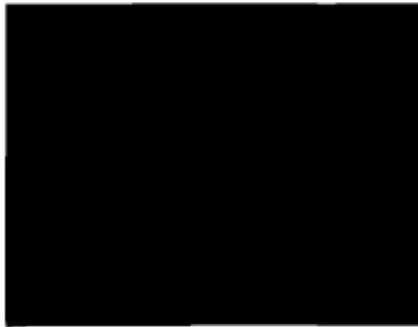
(b) Pulmón creado por ingeniería

FIGURA 38



(a) DMEM + FBS at 10%: PCNA

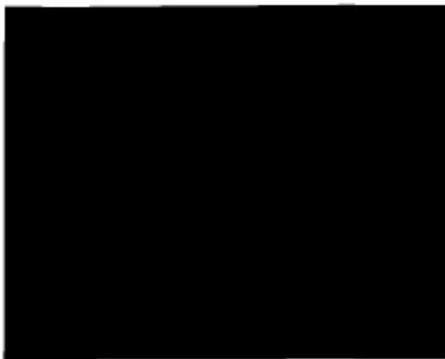
(b) BGJb: PCNA



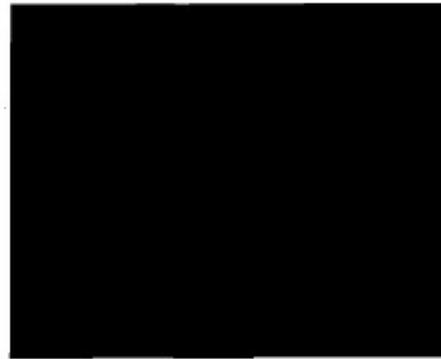
(c) DMEM + FBS at 10%: SPC



(d) BGJb: SPC



(e) DMEM + FBS at 10%: CCSP



(f) BGJb: CCSP

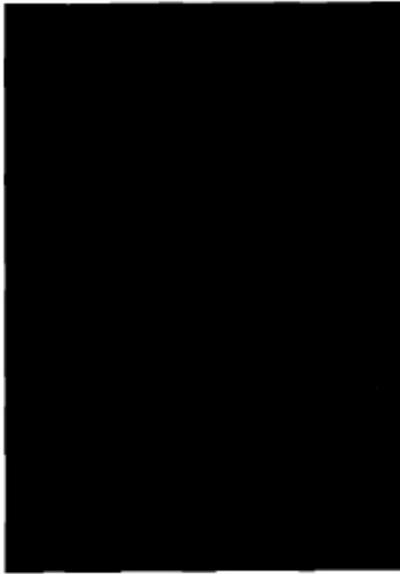
FIGURA 39



FIGURA 40



(a) Acuaporina

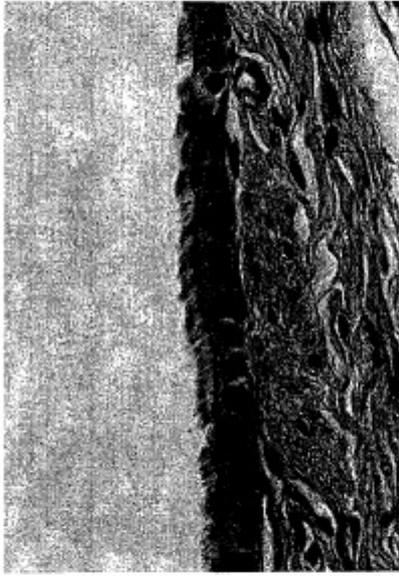


(b) SPC



(c) CCSP

FIGURA 41

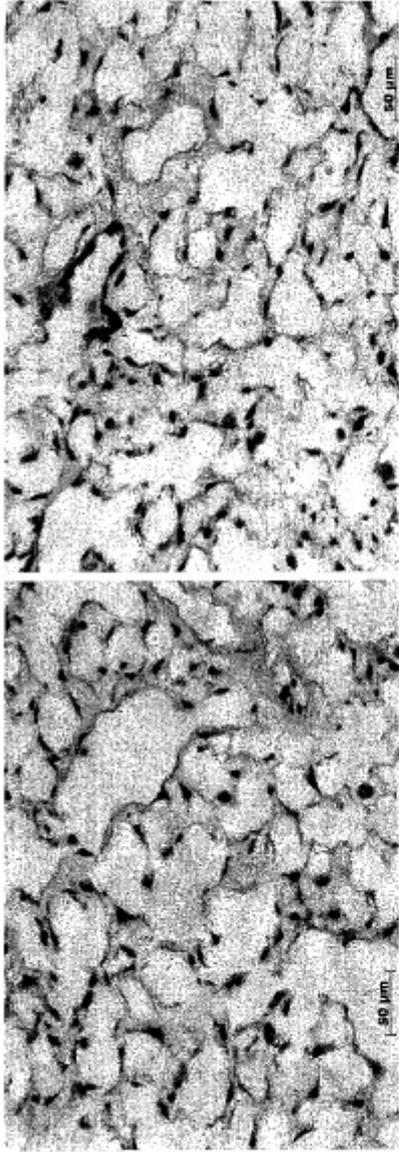


(a) Pulmón nativo

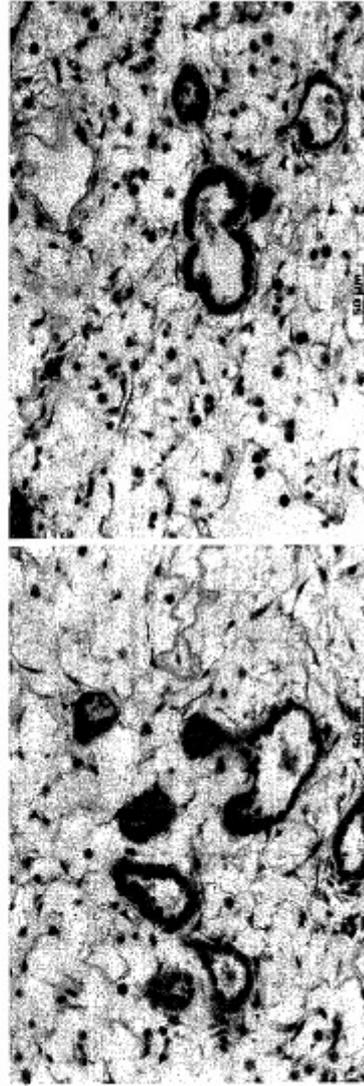


(b) Pulmón creado por ingeniería

FIGURA 42

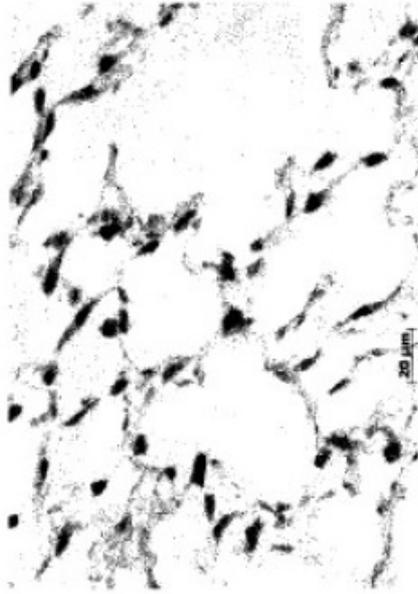


(a) Ventilación

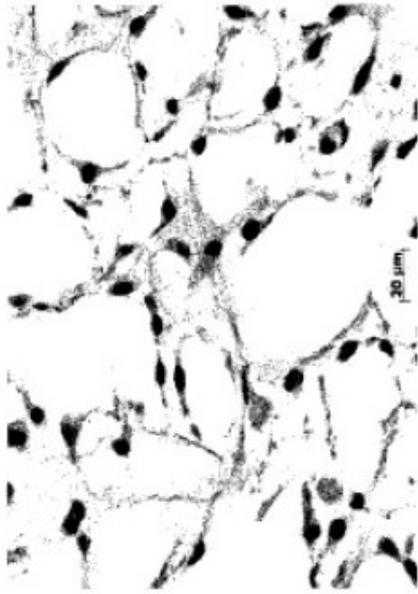


(b) Perfusión

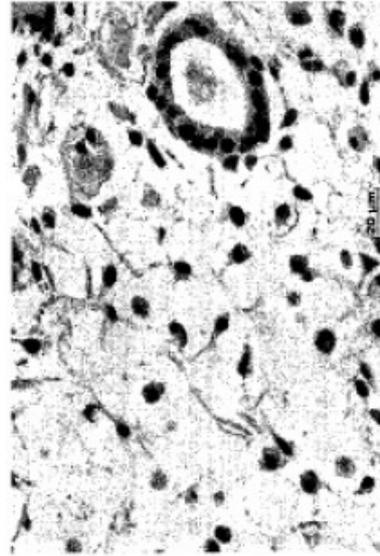
FIGURA 43



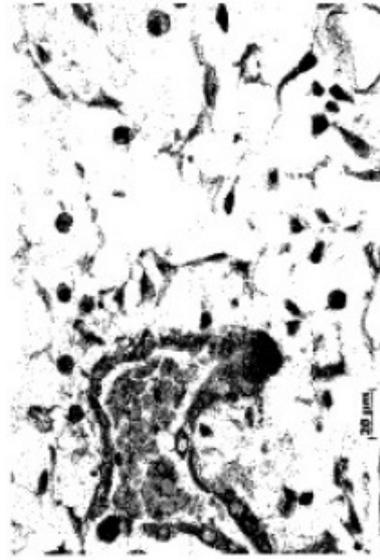
(a) Ventilación: PCNA



(b) Ventilación: TUNEL

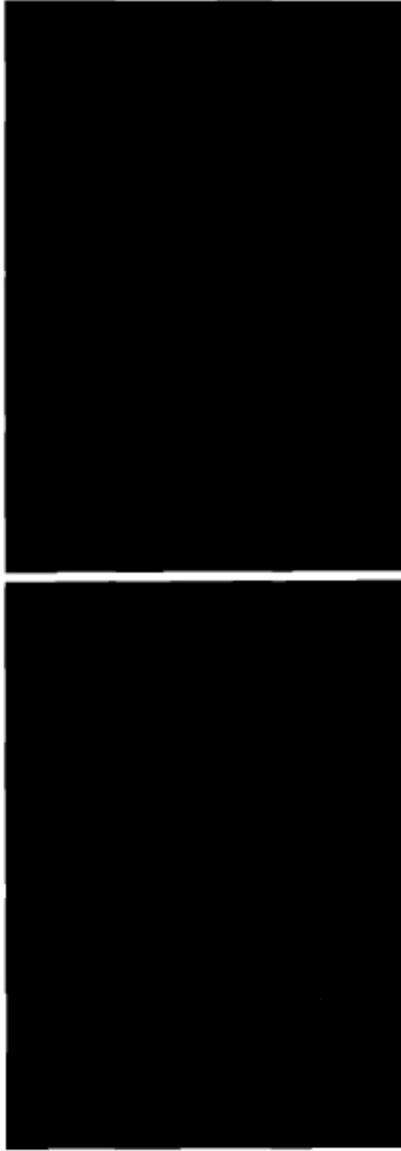


(c) Perfusión: PCNA



(d) Perfusión: TUNEL

FIGURA 44

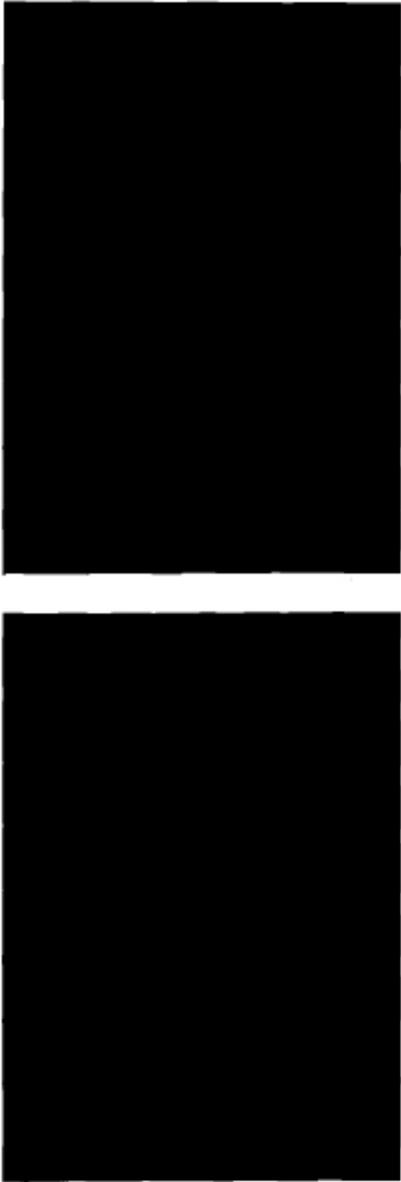


(a) Ventilación



(b) Perforación

FIGURA 45



(a) Ventilación



(b) Perfusión
FIGURA 46

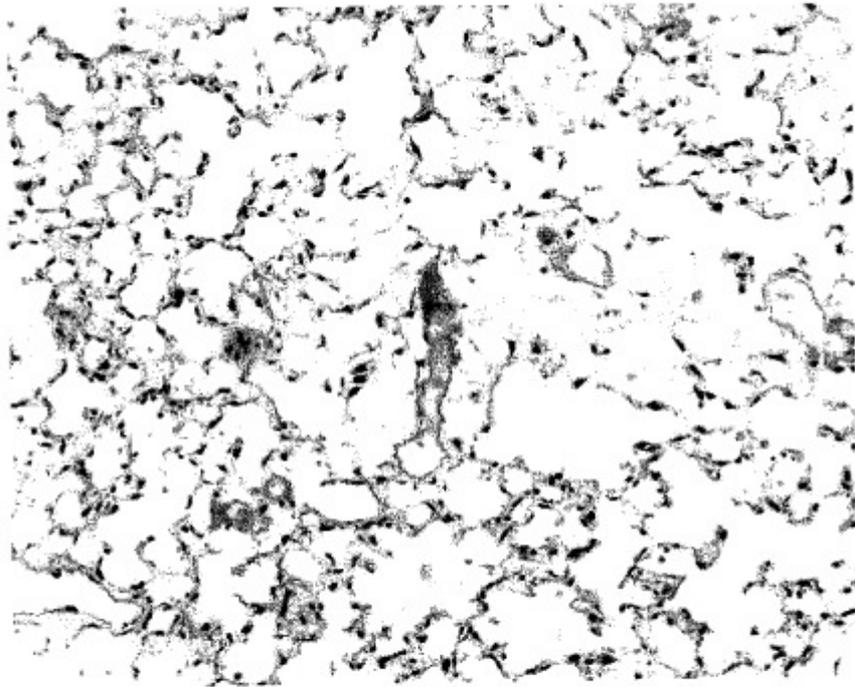
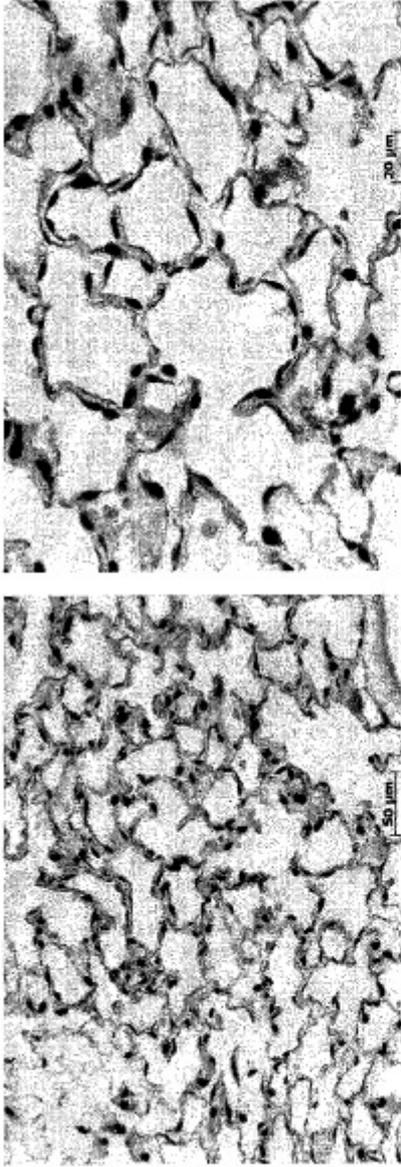
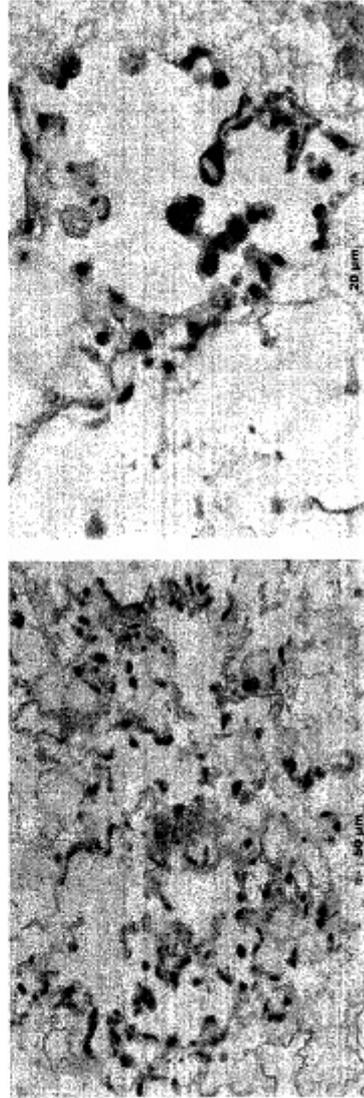


FIGURA 47

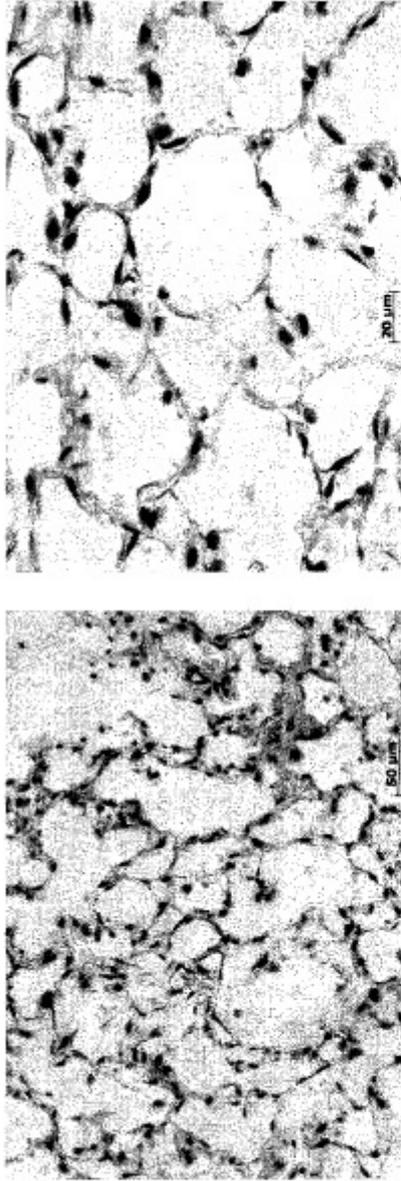


(a) Endotelio creado por ingeniería, con perfusión vascular a 3 ml/min

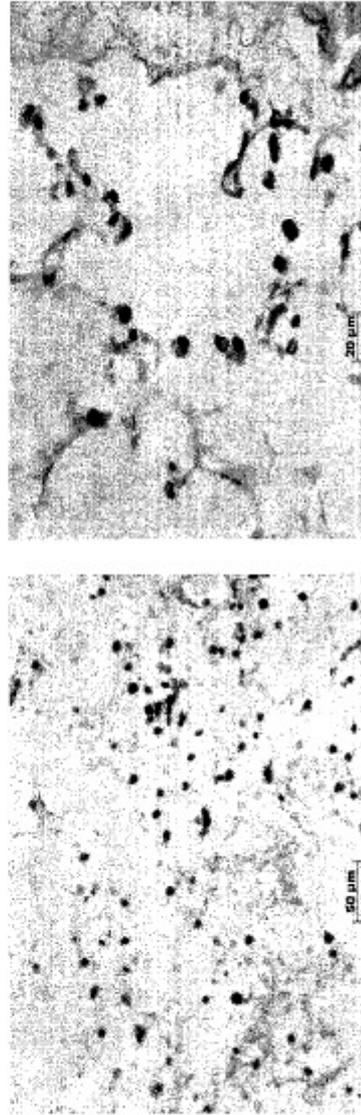


(b) Endotelio creado por ingeniería, con ventilación a 1 respiración/min

FIGURA 48



(a) Endotelio creado por ingeniería, con perfusión vascular a 3 ml/min



(b) Endotelio creado por ingeniería, con ventilación a 1 respiración/min

FIGURA 49

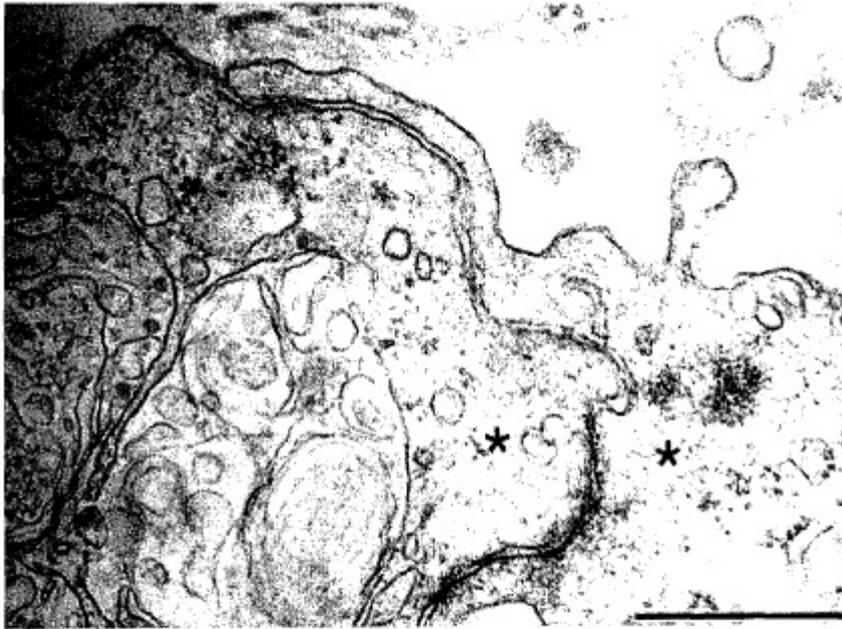


FIGURA 50



(a) Pulmón nativo



(b) Pulmón perfundido creado por ingeniería

FIGURA 51

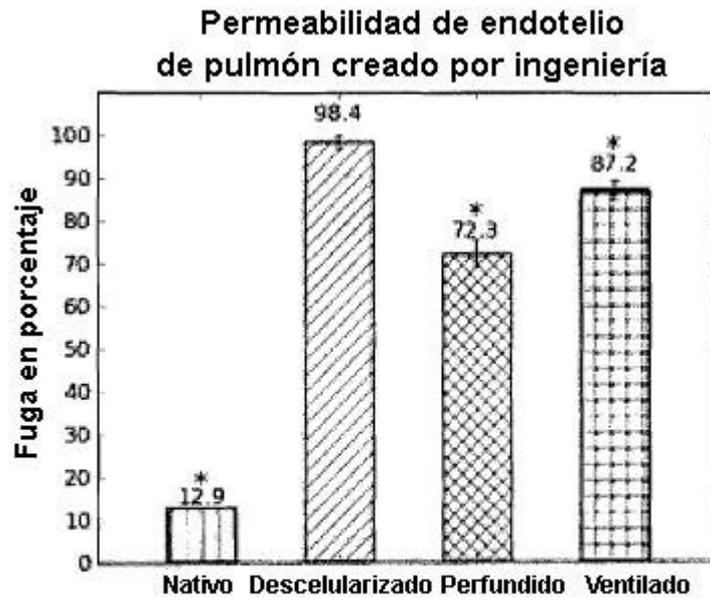


FIGURA 52

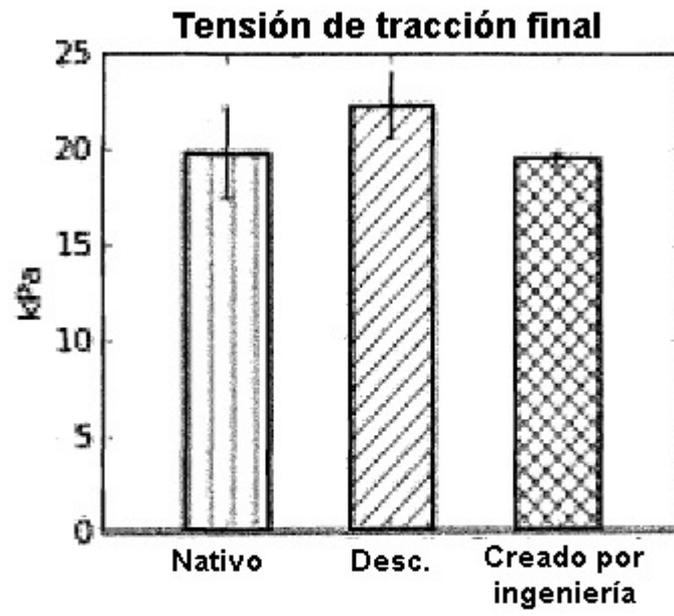
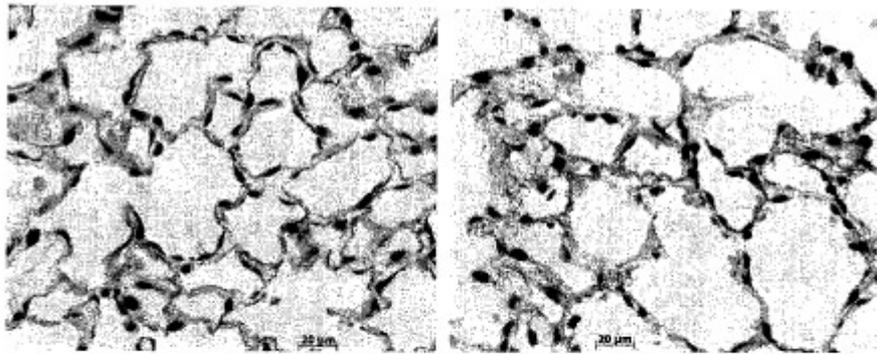
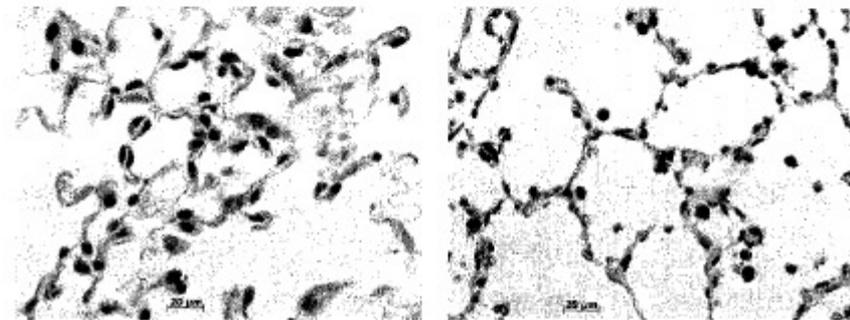


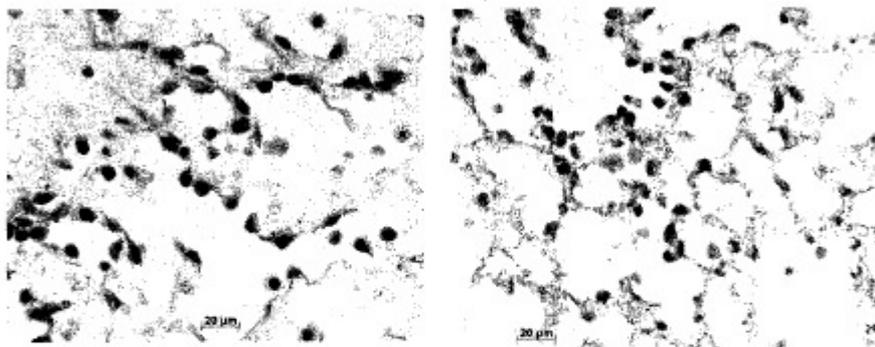
FIGURA 53



(a) Medio completo MCDB-131, con FBS al 10% y factores de crecimiento

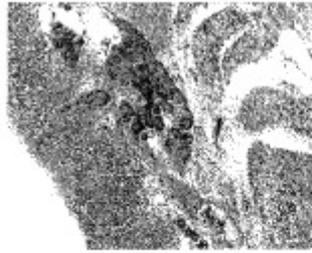


(b) MCDB-131, con FBS al 10%, sin factores de crecimiento

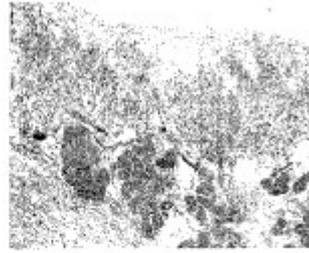


(c) DMEM con FBS al 10%

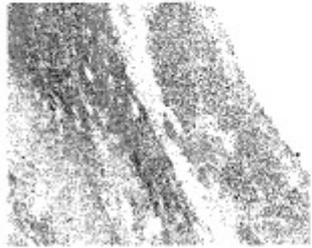
FIGURA 54



**Tráquea desc.
(2 h CHAPS)**



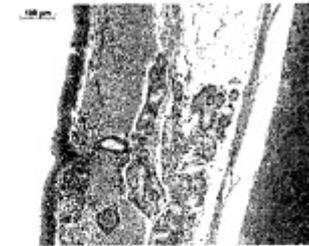
**Tráquea desc.
(4 h CHAPS)**



**Tráquea desc.
(8 h CHAPS)**



**Tráquea desc.
(24 h CHAPS)**



Tráquea nativa

FIGURA 55

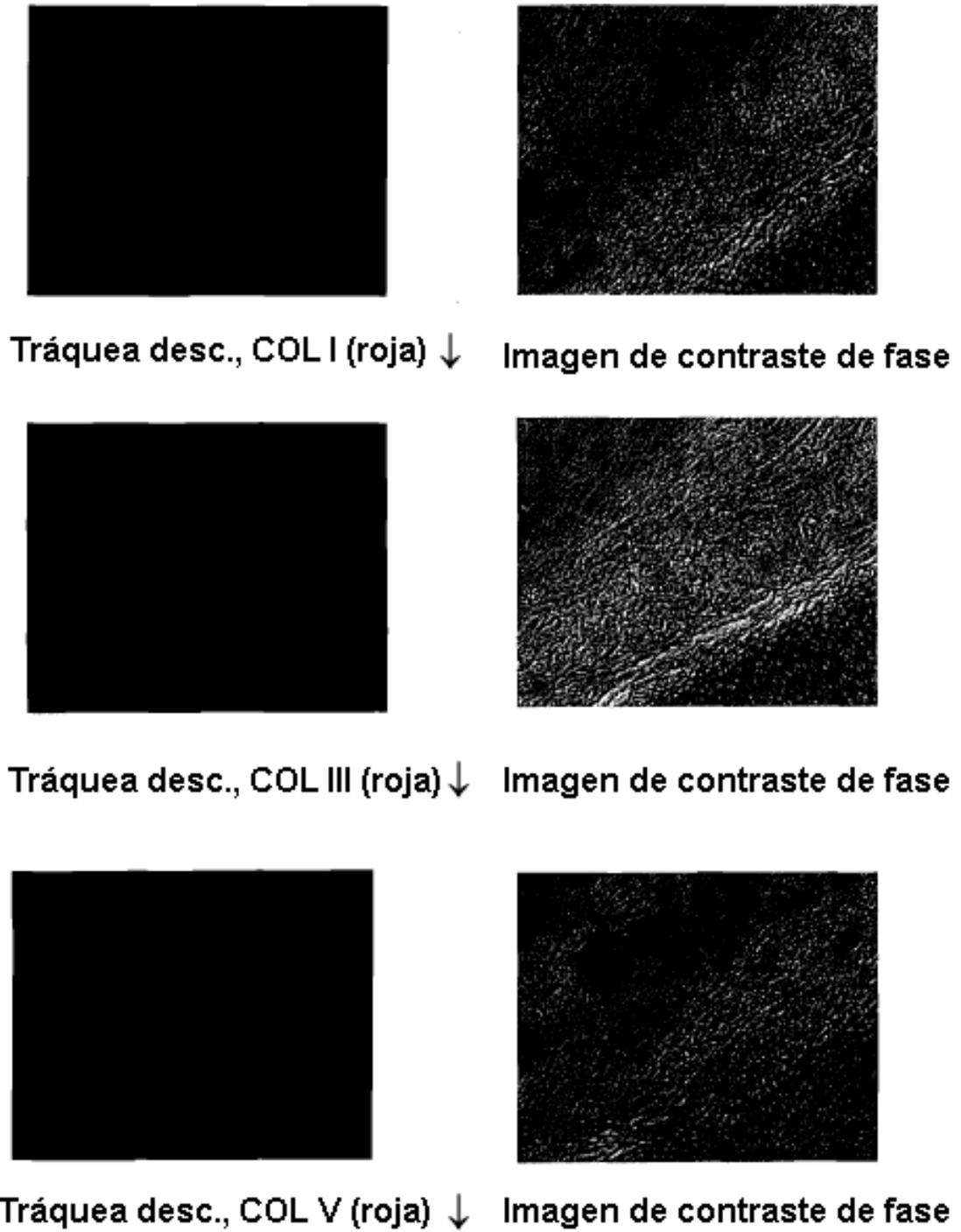
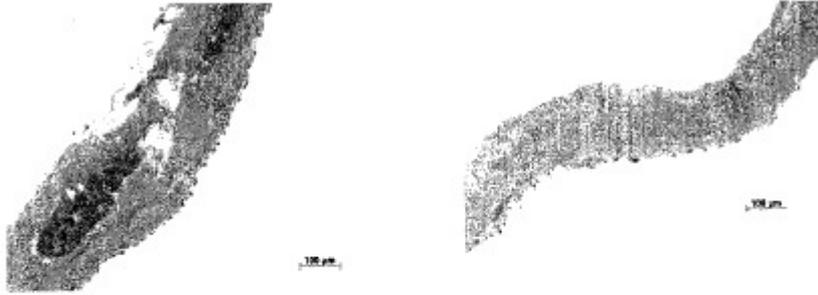


FIGURA 56

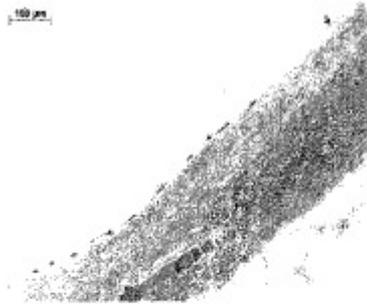


3 días tras la siembra

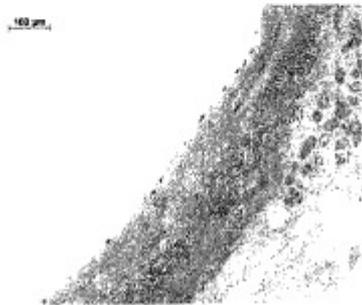


6 días tras la siembra

FIGURA 57



1 día tras la siembra



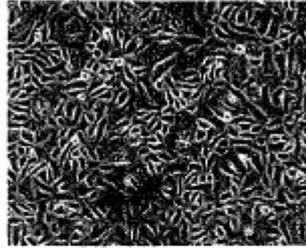
3 días tras la siembra



6 días tras la siembra

FIGURA 58

Células de control (sin virus)



Células con GFP-lentivirus durante 6h

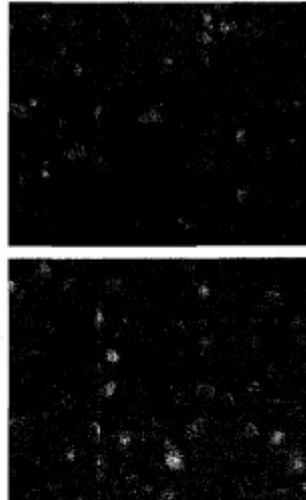


FIGURA 59

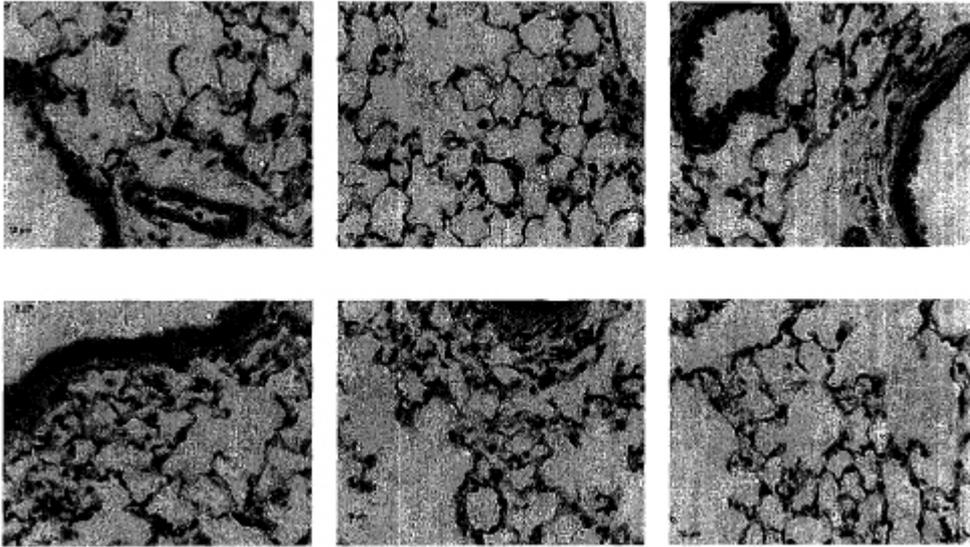


FIGURA 60

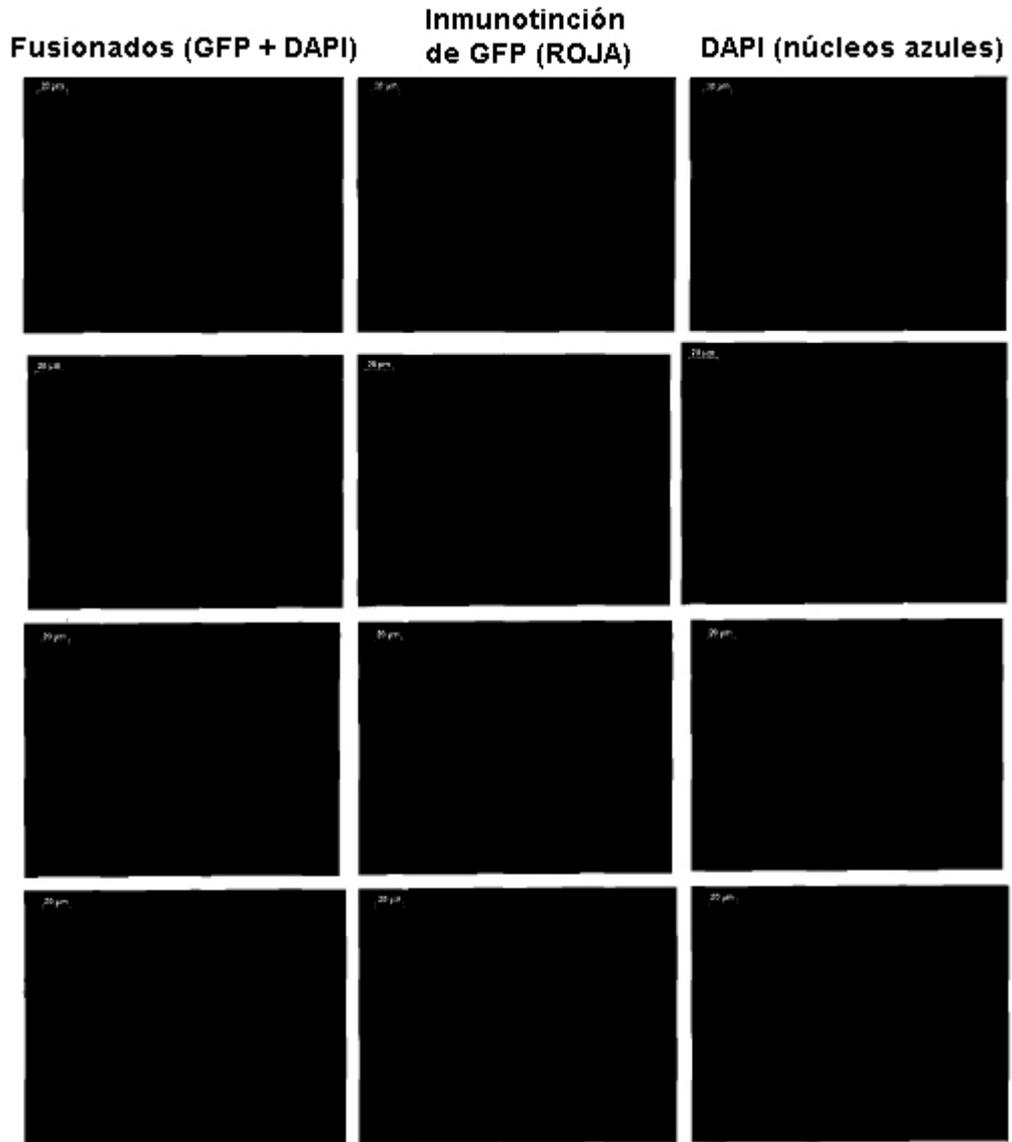


FIGURA 61

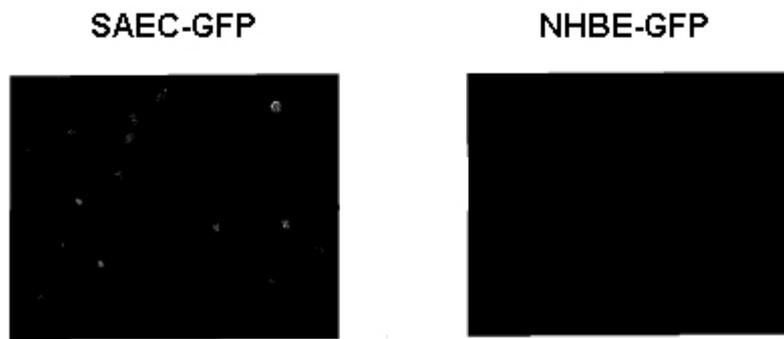


FIGURA 62

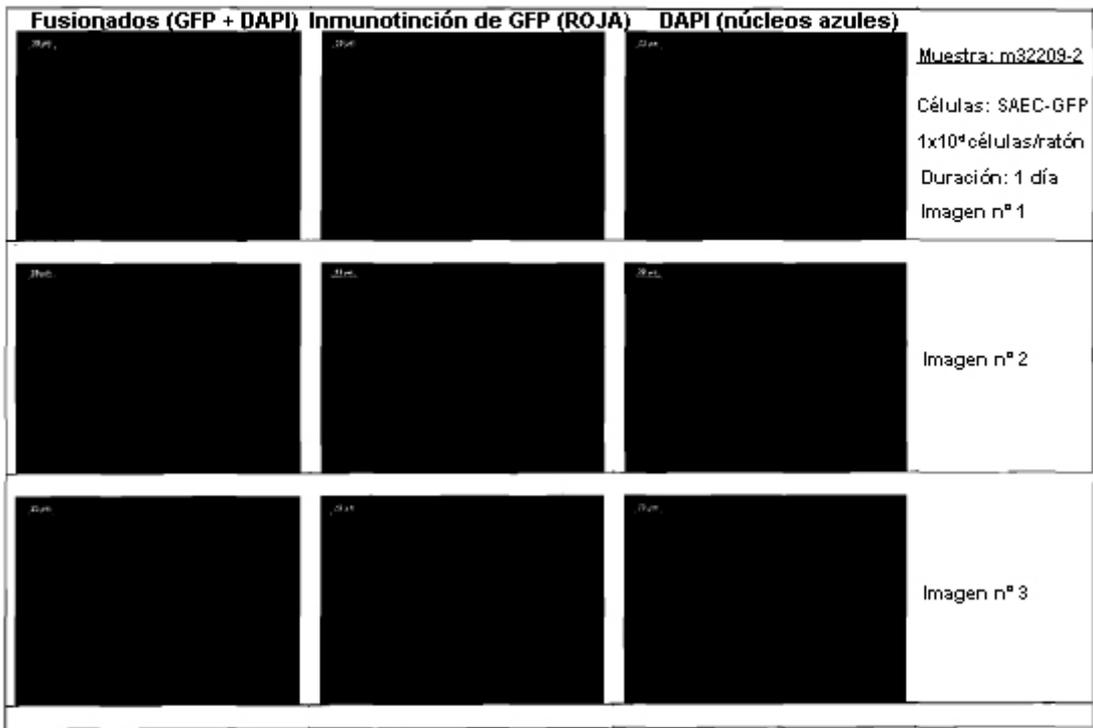


FIGURA 63A

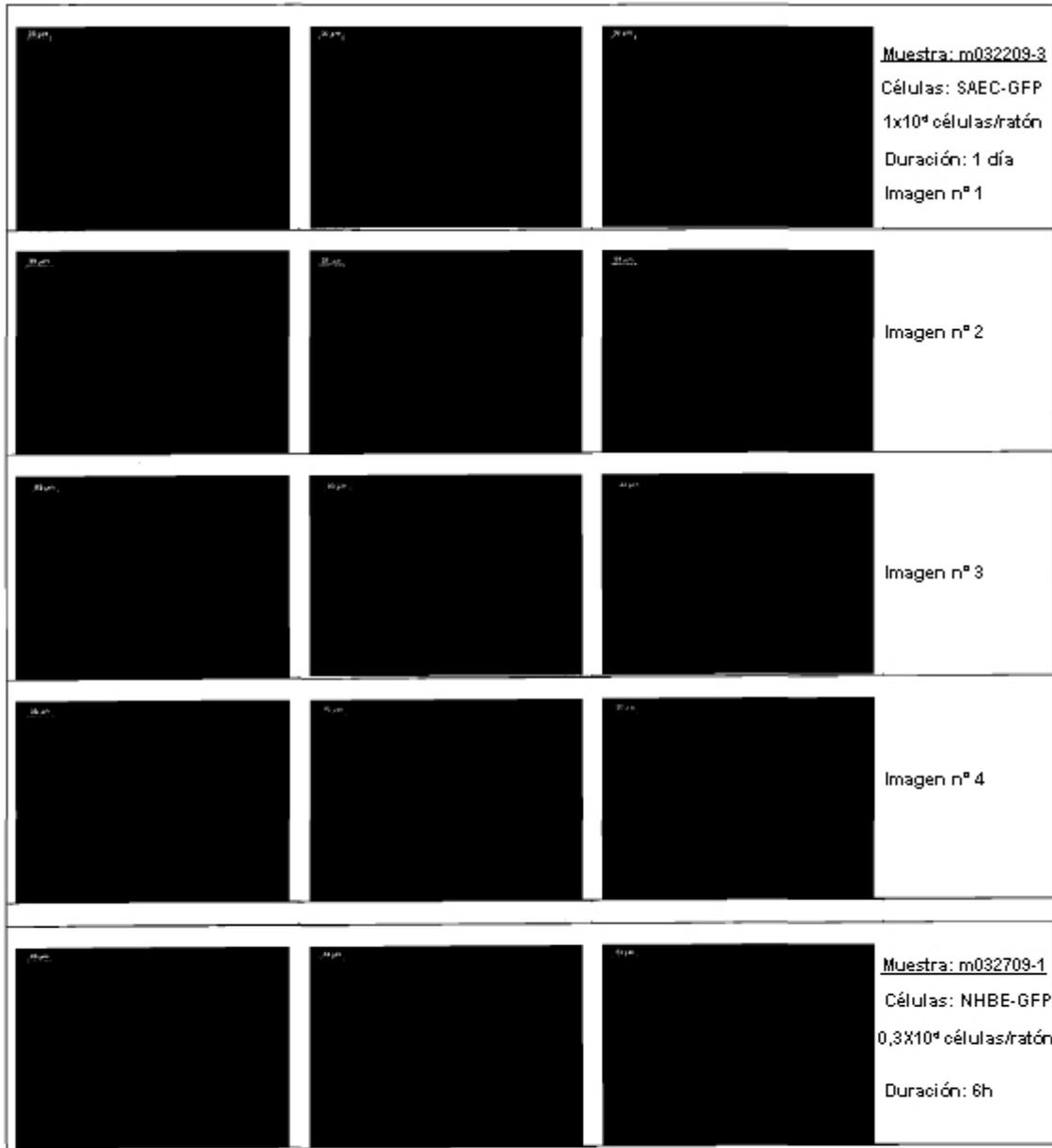


FIGURA 63B



FIGURA 63C

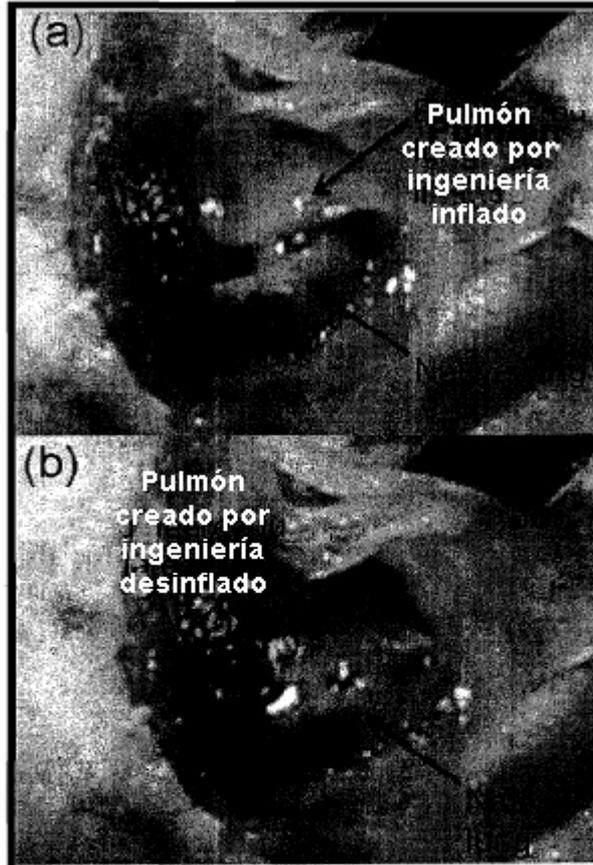


FIGURA 64