

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 622 170**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/071** (2010.01)

**C12M 3/06** (2006.01)

**A61L 27/38** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.09.2008 PCT/US2008/077447**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.04.2009 WO09042639**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.09.2008 E 08833430 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.01.2017 EP 2203554**

54 Título: **Método para crear sistemas de microvasos perfundibles**

30 Prioridad:

**24.09.2007 US 860471**

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

**05.07.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**NEUMANN, THOMAS;  
TOUROVSKAIA, ANNA;  
FAUVER, MARK, E. y  
YU, JULIA, OI YAN**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 622 170 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Método para crear sistemas de microvasos perfundibles

5 **Campo de la invención**

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

10

**Antecedentes técnicos**

Durante los procesos normales del crecimiento vascular (por ejemplo, el ciclo menstrual, la placentación, los cambios en la adiposidad, la reparación de heridas, la inflamación), la creación de nuevos vasos sanguíneos está regulada y finalmente cesa. Significativamente, la desregulación del crecimiento vascular es un elemento crítico de patología. Por ejemplo, el crecimiento tumoral, las retinopatías diabéticas, la artritis y la psoriasis implican una excesiva proliferación de vasos sanguíneos que contribuye directamente al estado patológico. En contraste, la alteración del crecimiento vascular, característico de individuos de edad avanzada, compromete la curación de heridas y la revascularización de los tejidos que se han vuelto isquémicos por traumatismo o enfermedad. Por lo tanto, una comprensión de los mecanismos que dirigen el ensamblaje de nuevos vasos sanguíneos y los procesos que inician y detienen el crecimiento vascular, es central para el desarrollo de estrategias para controlar la vascularización en enfermedades.

Durante el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis), surgen brotes de células endoteliales que revisten los lúmenes de los capilares y las vénulas poscapilares - las ramas más pequeñas del sistema vascular. La angiogénesis es un proceso complejo de múltiples etapas. Aunque los estudios publicados de angiogénesis son de muchos miles, los mecanismos celulares que median y regulan el crecimiento angiogénico y la morfogénesis están mal comprendidos.

Los detalles del brote angiogénico son difíciles de observar en "tiempo real" *in vivo* a causa de la opacidad de la mayoría de los tejidos. Las secciones tisulares son difíciles de reconstruir en 3D y no comunican la naturaleza dinámica del crecimiento vascular. Además, la región cerca de las puntas de los brotes angiogénicos - un área crítica de control de invasión vascular y morfogénesis - se encuentra raramente en secciones tisulares. Para superar las limitaciones de la histología convencional, se ha desarrollado diversos "modelos" de angiogénesis *in vivo* e *in vitro*.

**Modelos de angiogénesis *in vivo*:** Para superar la opacidad de los tejidos vivos, los investigadores han observado la angiogénesis a través de "ventanas" en animales vivos que incluyen las colas transparentes de forma natural de larvas de anfibio (Clark y Clark 1939), o cámaras de visión especializadas implantadas en orejas de conejo (Clark y Clark 1939), piel de ratón (Algire, Chalkley *et al.* 1945) y buches de hámster (Greenblatt y Shubi 1968) o desarrolladas a partir de bolsillos de córnea de conejo (Gimbrone, Cotran *et al.* 1974) o membranas corioalantoicas de pollo (Ausprunk, Knighton *et al.* 1974). A partir de estos primeros estudios en gran medida descriptivos proviene la validación del paradigma central de quimiotaxis vascular inducida por tumor y el correspondiente descubrimiento de moléculas difundibles derivadas del tumor, que promueven el crecimiento vascular. Los ensayos más nuevos de angiogénesis *in vivo* miden el crecimiento vascular hacia el interior en esponjas poliméricas o tapones de proteínas de membrana basal gelificadas implantadas de forma subcutánea en roedores (Passaniti, Taylor *et al.* 1992; Andrade, Machado *et al.* 1997; Akhtar, Dickerson *et al.* 2002; Koike, Vernon *et al.* 2003). Por todo su refinamiento, los enfoques *in vivo* se hacen difíciles por: (1) variación entre especies en la respuesta angiogénica de un animal a otro; (2) la ausencia de traducción de los resultados de una especie a otra; (3) altos costes de adquisición de animales y mantenimiento; (4) desaprobación pública de uso de animales para propósitos de investigación; y (5) las complejidades encontradas en cirugías en animales y en la visualización y evaluación de los resultados.

**Modelos bidimensionales (2D) de angiogénesis *in vitro*:** En un esfuerzo por comprender los mecanismos moleculares del angiogénesis, se cultivaron células endoteliales aisladas de vasos grandes en placas planas hasta que formaron monocapas confluyentes de tipo pavimento que simulaban los revestimientos endoteliales de los vasos sanguíneos (Jaffe, Nachman *et al.* 1973; Gimbrone 1976). Aunque son útiles como modelos de respuestas proliferativas para lesión endotelial en vasos sanguíneos grandes (Gimbrone, Cotran *et al.* 1974; Fishman, Ryan *et al.* 1975; Madri y Stenn 1982; Madri y Pratt 1986; Jozaki, Marucha *et al.* 1990; Rosen, Meromsky *et al.* 1990), los cultivos de monocapa de células endoteliales en sustratos rígidos no se organizan normalmente en tubos de tipo capilar en simulación de la angiogénesis. En 1980, sin embargo, después del cultivo a largo plazo satisfactorio de células endoteliales capilares (Folkman, Haudenschild *et al.* 1979), se informó de que cultivos de 20-40 días de células endoteliales capilares bovinas o humanas desarrollaban una red celular 2D en la parte superior de la monocapa celular confluyente, un proceso llamado "angiogénesis *in vitro*" (Folkman y Haudenschild 1980). Las células endoteliales de la red aparecían como "tubos" con "lúmenes" rellenos de un material fibrilar/amorfo que se interpretaba como una red sintetizada de forma endógena de "mandriles" sobre la que las células se organizaban. Estudios posteriores informaron de la formación de redes 2D similares por células endoteliales a partir de vasos

grandes (Maciag, Kadish *et al.* 1982; Madri 1982; Feder, Marasa *et al.* 1983) y por células endoteliales sembradas en la parte superior de geles hidratados maleables de proteínas de membrana basal (por ejemplo, gel Matrigel®) (Kubota, Kleinman *et al.* 1988).

5 Aunque los modelos 2D de desarrollo vascular siguen en uso actualmente (el ensayo basado en Matrigel® (Kubota, Kleinman *et al.* 1988) está disponible en el mercado), dichos modelos carecen de las siguientes 5 características determinantes de angiogénesis verdadera:

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

15 **2. Direccionalidad** - En modelos 2D las redes de células endoteliales se forman *in vitro* más o menos simultáneamente a través de un campo de células preposicionadas, mientras que la angiogénesis *in vivo* implica la invasión vectorial de la matriz extracelular por brotes filamentosos que arborizan en múltiples niveles de ramificación.

20 **3. Polaridad correcta** - Aunque los modelos 2D forman tubos unicelulares que se parecen notablemente a los capilares (Maciag, Kadish *et al.* 1982; Feder, Marasa *et al.* 1983; Sage y Vernon 1994), su polaridad es "de dentro hacia afuera", es decir, depositan material de la membrana basal en sus superficies lumbales y tienen sus superficies trombogénicas enfocando hacia afuera al medio de cultivo adyacente (Maciag, Kadish *et al.* 1982; Feder, Marasa *et al.* 1983) - opuesto a la situación *in vivo*.

25 **4. Formación del lumen** - Las evidencias de que los modelos 2D generan tubos de células endoteliales (EC) con lúmenes permeables son débiles. Normalmente, los tubos de células endoteliales tienen espacios "lumbales" que se rellenan con matriz extracelular (exógena o sintetizada por las células) (Maciag, Kadish *et al.* 1982; Madri 1982; Feder, Marasa *et al.* 1983; Sage y Vernon 1994; Vernon, Lara *et al.* 1995). Cuando están presentes, los lúmenes permeables habitualmente aparecen como espacios de tipo ranura o cilíndricos estrechos unidos por paredes gruesas de citoplasma de células endoteliales - bastante diferente de los tubos de células endoteliales de pared delgada inflados que tipifican los capilares *in vivo*.

30 **5. Especificidad celular** - Las redes celulares en modelos 2D se generan por procesos mecánicos que pueden conseguirse por tipos de células no EC (Vernon, Angello *et al.* 1992; Vernon, Lara *et al.* 1995). De hecho, el modelado matemático ha demostrado que cualquier tipo de célula adherente capa de aplicar fuerzas de tensión a matriz extracelular 2D maleable (sintetizada de forma endógena o suministrada (por ejemplo, gel Matrigel®)) pueden generar redes en condiciones óptimas (Manoussaki, Lubkin *et al.* 1996).

35 **Modelos tridimensionales (3D) de angiogénesis *in vitro*:** el reconocimiento de que la angiogénesis *in vivo* se produce dentro de una matriz extracelular 3D ha conducido a diversos modelos en que se induce el brote dentro de geles 3D de matriz extracelular *in vitro*. En un primer modelo 3D, las células endoteliales dispersadas dentro de geles de colágeno (Montesano, Orci *et al.* 1983) formaban redes de cordones y tubos (Elsdale y Bard 1972). Aunque los tubos de células endoteliales mostraban la polaridad correcta, las características de invasión y direccionalidad estaban ausentes (las células endoteliales se preincluían y finalmente se dispersaban en la matriz extracelular. No obstante, este enfoque ha demostrado utilidad en estudios de formación de lumen (Davis y Camarillo 1996) y de respuestas de células endoteliales a factores de crecimiento (Madri, Pratt *et al.* 1988; Merwin, Anderson *et al.* 1990; Kuzuya y Kinsella 1994; Marx, Perlmutter *et al.* 1994; Davis y Camarillo 1996).

45 En un enfoque alternativo, secciones de 1 mm (anillos) de aorta de rata incluidas en un coagulo de plasma 3D generaban tubos anastomosados de ramificación (Nicosia, Tchao *et al.* 1982). Los brotes desde los anillos aórticos mostraban invasión de tipo angiogénesis y direccionalidad además de polaridad. Se han usado modelos de explantes utilizando anillos aórticos de ratas o segmentos microvasculares de ratones para estudiar a influencia de los tumores, los factores de crecimiento, diversos soportes de matriz extracelular y condiciones de envejecimiento sobre la angiogénesis (Nicosia, Tchao *et al.* 1983; Mori, Sadahira *et al.* 1988; Nicosia y Ottinetti 1990; Nicosia, Bonanno *et al.* 1992; Villaschi y Nicosia 1993; Nicosia, Bonanno *et al.* 1994; Nicosia, Nicosia *et al.* 1994; Nicosia y Tuszynski 1994; Hoying, Boswell *et al.* 1996; Arthur, Vernon *et al.* 1998).

50 Existe diversos modelos que inducen que células endoteliales purificadas (como monocapas o agregados) broten de forma invasiva en geles de matriz extracelular 3D subyacentes o adyacentes (Montesano y Orci 1985; Pepper, Montesano *et al.* 1991; Montesano, Pepper *et al.* 1993; Nehls y Drenckhahn 1995; Nehls y Herrmann 1996; Vernon y Sage 1999; Vernon y Gooden 2002). Cada uno de estos modelos tiene limitaciones específicas que incluyen dificultad de la visualización de la formación de brotes, brotes limitados, un requisito para el seccionamiento o ausencia de eficacia con ciertos tipos de células endoteliales.

60 Wolverine y Gulec han descubierto un sistema de angiogénesis 3D (documento US 2002/0150879 A1) que implica incluir un fragmento de tejido tumoral en una matriz. El crecimiento hacia el exterior de microvasos puede caracterizarse para ensayar el potencial angiogénico de tejido. Sin embargo, este enfoque no proporciona perfusión luminal de los microvasos.

65 Neumann (el inventor de la presente invención) *et al.* 2003, ha descrito la posibilidad de crear microvasos perfundidos *in vitro* que pueden incluirse en un tejido artificial. Neumann *et al.* 2003 muestra el uso de un hilo de

pescar de nylon de 127 micrómetros como mandriles atrapados por tubos de contracción para formar microvasos. Los vasos se prepararon a partir de células de músculo liso aórtico de rata incluidas en agar. Estos microvasos eran de una naturaleza exploratoria, y no adecuados para crear un injerto de vaso humano.

5 Los modelos bidimensionales de crecimiento vascular *in vitro* no establecen las características determinantes de angiogénesis enumeradas previamente, mientras que los modelos 3D existentes reproducen algunas o la mayoría de las características. De forma importante, ninguno de los modelos 3D actualmente disponibles reconstruye un vaso sanguíneo precursor que contenga un fluido de circulación presurizado, que fluye. Por consiguiente, ninguno de los modelos 3D *in vitro* existentes permite estudiar la contribución de la presión luminal y el flujo al crecimiento vascular y la morfogénesis.

15 Frerich *et al*, 2006 (Head Face Med., agosto 16, 2:26) se refiere a un modelo *in vitro* para un vaso de diámetro pequeño hecho de células estromáticas de tejido adiposo y células endoteliales de vena umbilical humana en una estructura de gelatina de tipo tubo. Frerich *et al*, 2008 (Int J. Oral Maxillofac. Surg., 37:459-466) se refiere a construcciones de tipo tubo de diámetro pequeño (o "equivalentes de vaso") fabricadas de estructuras de gelatina porcina y sembradas con células estromáticas de tejido adiposo humano y células endoteliales de vena umbilical.

### Sumario de la descripción

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

(1) Un método para formar redes de microvasos perfundibles *in vitro* que comprende las etapas de:

25 moldear una matriz alrededor de un mandril en una cámara de un dispositivo de perfusión de cultivo;  
retirar el mandril para crear un canal dentro de la matriz, donde el mandril se retira por extracción o por descomposición;  
sembrar células endoteliales en al menos un canal dentro de la matriz;

30 activar la competencia de las células endoteliales para brotar como microvasos a partir de vasos precursores, donde la competencia para los brotes se activa por la densidad de siembra;

35 perfundir el al menos un canal con al menos un medio de perfusión para permitir que las células formen al menos un vaso precursor;  
incubar y perfundir el al menos un vaso precursor con al menos un medio de perfusión para mantener la viabilidad y proporcionar el brote de microvasos desde el al menos un vaso precursor en la matriz adyacente;  
y  
cultivar los microvasos de brote hasta que los microvasos han formado redes.

40 (2) El método del párrafo 1 donde la mayoría de las células endoteliales están en contacto célula a célula entre sí.

(3) El método del párrafo 1 donde las células endoteliales están presentes en al menos 250 células por milímetro cuadrado del canal, por ejemplo, una densidad de 250 a 2000 células por milímetro cuadrado del canal.

45 (4) El método del párrafo 1 donde los microvasos que brotan de los vasos precursores anastomosan para formar las redes de microvasos.

(5) El método del párrafo 1 donde los vasos precursores sustentan el crecimiento de al menos un tipo celular de un tejido incluido dentro de la matriz.

(6) El método del párrafo 5 donde los vasos precursores son series 3D de vasos precursores.

50 (7) El método del párrafo 1 donde al menos un tipo celular adicional se siembra en el al menos un canal dentro de la matriz, donde el al menos un tipo celular adicional se elige del grupo que consiste en células de músculo liso, células fibroblásticas, pericitos, células progenitoras, células madre, células parenquimáticas, células estromáticas, células musculares, células hepáticas, células pulmonares, células cutáneas, células epiteliales, células humanas, células animales, células eucariotas, células modificadas por ingeniería genética, células modificadas genéticamente, células enfermas, células infectadas por virus, células cancerosas y combinaciones de las mismas.

55 (8) El método del párrafo 1 donde las células endoteliales son de líneas celulares endoteliales, y donde las líneas celulares endoteliales se eligen del grupo que consiste en líneas celulares endoteliales microvasculares, líneas endoteliales macrovasculares y líneas celulares endoteliales procedentes de individuos.

(9) El método del párrafo 7 donde las células liberan productos bioactivos en el medio de perfusión, o en la matriz, o ambos.

60 (10) El método del párrafo 1 donde las células endoteliales contienen marcadores moleculares modificados por ingeniería genética para el endotelio arterial o las células endoteliales contienen marcadores moleculares modificados por ingeniería genética para endotelio linfático, o las células endoteliales contienen marcadores moleculares modificados por ingeniería genética para endotelio venoso.

65 (11) El método del párrafo 1 donde al menos un canal está poblado con células endoteliales y al menos un canal está poblado con al menos un tipo de células no endoteliales.

(12) El método del párrafo 1 donde la siembra del al menos un canal es por un proceso seleccionado del grupo

que consiste en inyección de células en el canal de matriz, y adhesión previa de las células al mandril, y por una combinación de adhesión previa de las células al mandril e inyección de las células en el canal de matriz.

(13) El método del párrafo 1 donde el al menos un canal en la matriz es de 20 micrómetros a 500 micrómetros de diámetro, o de 500 micrómetros a 5,5 mm de diámetro.

(14) El método del párrafo 1 donde la matriz comprende material seleccionado del grupo que consiste en fibrina, colágeno, subtipos de colágeno, gelatina, membrana basal gelificada, agar, agarosa, alginato, proteínas de membrana basal, proteínas de matriz extracelular, gel de sílice y células.

(15) El método del párrafo 14 donde las proteínas de membrana basal se eligen del grupo que consiste en colágeno de tipo IV, perlecano, laminina, integrinas, enactinas, distroglucanos, fibras de colágeno de tipo VII y microfibrillas de colágeno de tipo VII.

(16) El método del párrafo 14 donde las proteínas de matriz extracelular se seleccionan del grupo que consiste en proteoglicanos, glucosaminoglicanos, proteoglicanos de sulfato de heparina, proteoglicanos de sulfato de condroitina, proteoglicanos de sulfato de queratina, ácido hialurónico, colágeno, fibronectina, vitronectina, elastina y laminina.

(17) El método del párrafo 1 donde la matriz está poblada con células endoteliales, y células adicionales elegidas del grupo que consiste en células de músculo liso, pericitos, células fibroblásticas, células progenitoras, células madre, células musculares, células hepáticas, células pulmonares, células cutáneas, células epiteliales, células humanas, células animales, células vegetales, células eucariotas, células parenquimáticas, células estromáticas, células modificadas por ingeniería genética, células modificadas genéticamente, células enfermas células infectadas por virus, células cancerosas y combinaciones de las mismas.

(18) El método del párrafo 1 donde al menos un tejido está incluido en la matriz y donde el al menos un tejido se elige del grupo que consiste en tejido sano, tejido enfermo, tejido canceroso y tejido modificado por ingeniería genética.

(19) El método del párrafo 1 donde el flujo del al menos un medio de perfusión se aproxima *in vivo* al flujo de los vasos capilares.

(20) El método del párrafo 1 donde el flujo del al menos un medio de perfusión fluye preferentemente a través de la red de microvasos que conecta los vasos precursores disminuyendo el flujo en un vaso precursor y aumentando la resistencia en otro vaso precursor.

(21) El método del párrafo 1 donde el al menos un medio de perfusión comprende un medio de crecimiento celular que tiene componentes suplementarios seleccionados del grupo que consiste en factores angiogénicos, factores angiostáticos, suero, ésteres de forbol y factores de crecimiento.

(22) El método del párrafo 1 donde la oxigenación del al menos un medio de perfusión es sustancialmente por difusión a través de la matriz.

(23) Un método para formar redes de microvasos perfundibles *in vitro* en un dispositivo de perfusión de cultivo que comprende las etapas de:

moldear una matriz alrededor de mandriles en una cámara del dispositivo de perfusión de cultivo;

retirar los mandriles creando canales dentro de la matriz;

adherir el conducto a al menos un acceso de entrada y de salida;

sembrar células endoteliales en los canales a través del conducto;

distribuir las células dentro de los canales;

perfundir el dispositivo de perfusión de cultivo llenando los accesos de entrada y cebando el al menos un acceso de entrada y salida;

incubar el dispositivo de perfusión de cultivo para formar vasos precursores donde se produce el brote de microvasos desde los vasos precursores, donde las células están presentes en un valor mínimo para el brote de al menos 250 células adheridas por milímetro cuadrado de canal; y

formar redes de microvasos perfundibles incubando el dispositivo de perfusión de cultivo.

(24) Un método para detectar productos angiogénicos y angiostáticos que comprende las etapas de:

formar redes de microvasos perfundibles *in vitro* en un dispositivo de perfusión de cultivo de acuerdo con el método del párrafo 23;

añadir candidatos a posiciones dentro de la matriz donde los candidatos se seleccionan del grupo que consiste en células, productos y tejido;

perfundir e incubar el dispositivo de perfusión; y

medir el crecimiento 3D de las redes de microvasos en respuesta a los candidatos añadidos.

Se describe un método para crear redes de microvasos perfundibles *in vitro*. Se siembran células om en un canal dentro de una matriz. Las células capaces de brotar se activan para la competencia para brotar como microvasos desde vasos precursores. La competencia para el brote en las células se desencadena por la densidad de la siembra. El canal se perfunde con medio formando vasos precursores. Los vasos precursores se incuban y perfunden para mantener la viabilidad y para proporcionar el brote de los microvasos en la matriz adyacente. Los vasos precursores que brotan se cultivan hasta que han formado redes.

La presente descripción proporciona métodos y sistemas que superan las limitaciones de los modelos existentes de angiogénesis combinando métodos demostrados para generar brotes microvasculares tubulares e invasivos en

matriz extracelular (ECM) 3D con novedosas metodologías para la fabricación de un vaso precursor diseñado por ingeniería tisular que será la fuente del flujo luminal. A través de perfusión, pueden administrarse compuestos moduladores de la angiogénesis a la superficie luminal de las células endoteliales donde se sabe que residen receptores diana específicos.

5 La presencia de un flujo luminal de medio nutriente puede aumentar sustancialmente el tiempo de supervivencia y la estabilidad de los tubos capilares *in vitro*. La perfusión luminal ha demostrado tener un impacto positivo sobre el crecimiento y la maduración de los vasos. (Frerich, Zuckmantel et al. 2008). Esto implica que los vasos serían más estables con perfusión luminal. Además, la inclusión de células de músculo liso o de pericitos, células progenitoras endoteliales e incluso células madre en la formación de vasos precursores se creería que ayuda a funcionar como parte del proceso de maduración de los vasos.

15 El sistema de angiogénesis descrito puede usarse para evaluar diversos parámetros experimentales que incluyen hipoxia/hiperoxia, ensayo de compuestos bioactivos solubles o insolubles específicos, usos de células modificadas genéticamente y suministro génico a través de transfección/transducción vírica. Las interacciones homofílicas o heterotípicas entre células, las interacciones entre células y la matriz, las interacciones entre células y factores de crecimiento y el flujo mecánico, pueden examinarse como estímulos que inducen la señalización celular que finalmente activa las células para un comportamiento fenotípico integrado tal como el observado en el brote de microvasos a partir de vasos precursores.

20 Adicionalmente, puede evaluarse la contribución de las fuerzas físicas de siembra a alta densidad para el brote del fenotipo de competencia. Sin limitarse a teoría particular alguna, por ejemplo, la siembra de células endoteliales a alta densidad provoca una compresión física donde las células endoteliales se apelotonan durante el proceso. Como las células endoteliales normalmente se expanden lateralmente en la formación de vasos que inicialmente no es posible durante la siembra donde las células están fuertemente compactadas juntas. Por tanto, el crecimiento en la matriz puede favorecerse desencadenando el fenotipo de brote. Además, con una cantidad mayor de células por área superficial luminal, pueden formarse brotes mucho más rápidamente por migración simple y coalescencia de células en lugar de por división celular. Las contribuciones de los genes y de los productos génicos que regulan dichos fenotipos celulares en la formación de los vasos pueden dilucidarse. El sistema permite el estudio de la angiogénesis respecto a la reparación de heridas, el envejecimiento, el cáncer, la psoriasis, la retinopatía diabética, las enfermedades inflamatorias, la apoplejía y la aterosclerosis.

35 De forma importante, puede adaptarse un modelo siguiendo los contenidos de la descripción para proporcionar sistemas vasculares completamente funcionales capaces de incorporarse en tejidos artificiales biodiseñados.

La presente descripción también proporciona enfoques nuevos y novedosos, incluyendo un diseño de colector para fabricar microvasos, fabricar microvasos a partir células endoteliales y fabricar vasos más grandes (por ejemplo, que tengan el tamaño de arterias coronarias). Estos y otros nuevos contenidos importantes, incluyendo, por ejemplo, un método para la creación de redes microvasculares son evidentes a partir de la memoria descriptiva y de las reivindicaciones a continuación en este documento.

**Breve descripción de los dibujos**

45 La FIG. 1A, la FIG. 1B y la FIG. 1C muestran esquemáticamente un ejemplo de la creación de vasos precursores.  
 La FIG. 2A, la FIG. 2B, la FIG. 2C y la FIG. 2D muestran esquemáticamente un ejemplo de un proceso de contracción por calor conocido.  
 La FIG. 3A muestra esquemáticamente un diseño conocido para montar dispositivos de cultivo/perfusión.  
 50 La FIG. 3B muestra esquemáticamente un diseño usado en un método de fabricación para montar dispositivos de cultivo/perfusión.  
 La FIG. 4A y la FIG. 4B muestran esquemáticamente la creación de colectores para dispositivos de cultivo/perfusión.  
 La FIG. 5A, la FIG. 5B y la FIG. 5C muestran esquemáticamente un diseño alternativo para dispositivos de cultivo/perfusión microfabricados.  
 55 La FIG. 6 muestra esquemáticamente un procedimiento de siembra de células.  
 La FIG. 7 muestra un esquema de una red capilar entre dos vasos precursores bioartificiales.  
 La FIG. 8 muestra una imagen *in vitro* de un ejemplo de una pluralidad de mandriles después de la siembra con células de músculo liso.  
 La FIG. 8B muestra un ejemplo de una placa muscular perfundida.  
 60 La FIG. 9 muestra esquemáticamente un CPD alternativo.  
 La FIG. 10 muestra un único vaso precursor con brotes de crecimiento en la matriz adyacente.  
 La FIG. 11 muestra un vaso precursor conectado a través de una red de brotes a un segundo vaso precursor.  
 La FIG. 12 muestra un método alternativo para crear células precursoras sembrando células en canales en una matriz de colágeno.  
 65 La FIG. 13A muestra métodos para activar la competencia de brote en células y en vasos precursores.  
 La FIG. 13B muestra esquemáticamente un CPD.

La FIG. 13C muestra esquemáticamente un CPD antes de llenar la cámara de matriz con colágeno y antes de la siembra de células.

La FIG. 13D muestra esquemáticamente un CPD después de la siembra de colágeno, la retracción del mandril y la siembra de células a través del mandril.

5 La FIG. 13E muestra esquemáticamente un CPD durante la perfusión.

La FIG. 14A muestra esquemáticamente un ejemplo de un canal dentro de una matriz sembrada con células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) a una alta densidad.

La FIG. 14B muestra esquemáticamente un canal dentro de una matriz sembrada con HUVEC donde la densidad celular produce un tapón dentro del canal.

10 La FIG. 14C muestra esquemáticamente un canal después de la perfusión que ha retirado las HUVEC no adherentes.

La FIG. 15A muestra un canal vacío en una matriz de colágeno.

La FIG. 15B muestra el canal de la FIG. 15A, con células adherentes después de la siembra a alta densidad.

15 La FIG. 15C representa esquemáticamente una sección transversal de un canal sembrado mostrado en la FIG. 15B.

La FIG. 16 muestra un canal de matriz inmediatamente después de la siembra de células endoteliales en gradiente de alta densidad en el Día 1 (panel superior). También se muestra el mismo canal después de 12 días de perfusión (panel inferior). La inducción de brote relacionada con la densidad celular es evidente (panel inferior).

20 La FIG. 17 muestra ejemplos de dos vasos precursores de brote competente que han crecido durante una semana y tres semanas experimentando anastomosis para formar redes de microvasos complejos,

La FIG. 18 muestra el crecimiento de vasos precursores y el brote asociado en microvasos de uno a ocho días.

La FIG. 19 muestra microvasos teñidos con aglutinina de germen de trigo marcada para mostrar la estructura del vaso y con el colorante fluorescente DAPI para mostrar los núcleos.

25 La FIG. 20A muestra esquemáticamente la densidad celular inicial de siembra representada frente a la posición a lo largo del microvaso precursor.

La FIG. 20B muestra una imagen de un microvaso precursor de brote a la densidad de siembra celular inicial con una superposición de un diagrama de la densidad celular.

30 La FIG. 20C muestra una imagen de un microvaso precursor de brote después de 24 h tras la siembra.

La FIG. 20D muestra una imagen de un microvaso precursor de brote después de 48 h tras la siembra.

La FIG. 20E muestra una imagen de un microvaso precursor de brote después de 72 h tras la siembra.

La FIG. 20F muestra una imagen de un microvaso precursor de brote después de 96 h tras la siembra.

35 La FIG. 21A muestra esquemáticamente un diagrama de la longitud promedio del brote (micrómetros) frente a la posición a lo largo del microvaso precursor (mm).

La FIG. 21B muestra esquemáticamente un diagrama de las líneas de mejor ajuste para la longitud promedio del brote (micrómetros) frente a la densidad inicial de siembra (número de células por mm cuadrado).

La FIG. 22 muestra una imagen de un brote compuesto con células endoteliales umbilicales humanas (HUVEC) teñidas con indicador celular verde (oscuro) y células de músculo liso de rata como retráctiles (transparente/claro) rodeando las HUVEC en una localización perivascular.

40 La FIG. 23 muestra esquemáticamente la siembra de células en un canal de matriz a una alta densidad y la formación del vaso precursor para un ensayo de brote de microvasos.

La FIG. 24A muestra esquemáticamente un ensayo de brote de microvasos con propiedades angiogénicas a partir de células, productos y tejidos presentes en cantidades mayores en un CPD.

45 La FIG. 24B muestra esquemáticamente un ensayo de brote de microvasos con propiedades angiogénicas a partir de células, productos y tejidos presentes en cantidades mayores en un CPD.

La FIG. 25A muestra esquemáticamente un ensayo de brote de microvasos con propiedades angiostáticas a partir de células, productos y tejidos presentes en cantidades mayores en un CPD.

La FIG. 25B muestra esquemáticamente un ensayo de brote de microvasos con propiedades angiostáticas a partir de células, productos y tejidos presentes en cantidades inferiores en un CPD.

50 La FIG. 26A es una imagen de campo brillante de dos canales de colágeno de CPD 2600, con uno sembrado con HUVEC que ha formado un vaso precursor de brote y el segundo sembrado con células de cáncer de mama 2608 de la línea celular BT474.

La FIG. 26B muestra una imagen de microscopía de fluorescencia correspondiente de los mismos canales de colágenos sembrados de un CPD de la FIG. 26A.

55 **Descripción detallada de las realizaciones preferidas**

El método de la presente invención es útil para el estudio del crecimiento vascular fisiológico y patológico, y el crecimiento vascular en respuesta a factores angiogénicos y angiostáticos. Otras aplicaciones útiles son para métodos que evalúan el potencial angiogénico de tejidos cancerosos y la respuesta a fármacos antiangiogénicos. Las aplicaciones y métodos adicionales son para investigación básica sobre la fisiología y la patología del brote de vasos. Adicionalmente, el método de la invención puede usarse para construir diversos dispositivos de curación de heridas y para la vascularización de construcciones diseñadas por ingeniería tisular.

65 En un ejemplo, se describe un método y un dispositivo para la creación de redes de microvasos tridimensionales perfundibles. Como se usa en este documento, "EC" se refiere a células endoteliales, "SMC" se refiere a células de

músculo liso y "CAS" se refiere a sustitutos de arteria coronaria.

Generalmente, los dispositivos para el cultivo y perfusión de redes de microvasos consisten en una cámara que aloja uno o más mandriles en el centro (como se muestra mejor en la FIG. 1). Las cámaras pueden fabricarse de cualquier material biocompatible y por varias técnicas, por ejemplo, emparedando marcos cortados por láser, perforando orificios y canales en láminas de silicona o técnicas de moldeado. Los mandriles se ensamblan dentro de la cámara de tal modo que sean retráctiles. Esto puede conseguirse ajustando los extremos de los mandriles en tubos, como por ejemplo, por contracción por calor (como se demuestra en la FIG. 2). El diámetro de los mandriles depende del calibre deseado del vaso. La configuración puede modificarse para acomodar vasos individuales, dos vasos o hasta series completas de vasos en 2D o 3D. Los mandriles pueden ser de diversos materiales, tales como fibras poliméricas, fibras de vidrio, hilos o similares.

Los microvasos se crean sembrando células en los mandriles, estimulando las células para multiplicarlas alrededor de los mandriles y extrayendo los mandriles cuando las células han formado las paredes de los vasos. Los vasos después se incluyen en una matriz. Dependiendo de las condiciones de cultivo, la composición de la matriz y la presencia de estímulos angiogénicos (por ejemplo, factores de crecimiento), los vasos precursores brotarán en la matriz adyacente. Los brotes anastomosan entre sí y, por tanto, conduciendo a la formación de redes de microvasos. Después de retirar los mandriles, los dispositivos se conectan a un sistema de perfusión y los vasos se someten a flujo de fluido luminal.

Con referencia ahora a la FIG. 1A, a la FIG. 1B y a la FIG. 1C, se muestra un ejemplo esquemático de la creación de vasos precursores. La FIG. 1A muestra células endoteliales 1 en un medio de crecimiento de cultivo 100, sembrado en el mandril 2 mantenido por los tubos de contracción 4 en un cuerpo 3 del dispositivo. La FIG. 1B muestra que las células 1 se han multiplicado y han formado una capa circular en forma de funda celular 102. La FIG. 1C muestra la funda celular después de la extracción del mandril 2 en un gel de matriz extracelular (ECM) 110 que está perfundido con medio de crecimiento de cultivo 100.

El método descrito en este documento comprende el diseño por ingeniería de estructuras de vasos bioartificiales perfundibles para aplicaciones de ingeniería tisular y modelos de investigación. El principio general del método descrito implica el cultivo de células en capas alrededor de mandriles extraíbles que están estrechamente ajustados en tubos de pared delgada o a otros conectores. Una vez las capas celulares han alcanzado un grosor deseado de pared, los mandriles se retiran y los vasos bioartificiales (BAV) creados de ese modo pueden perfundirse con medio de cultivo, sangre, sustitutos de sangre u otros fluidos por la ayuda de un sistema de perfusión. El método descrito permite la producción de vasos sanguíneos fabricados en masa o creados de forma personalizada, modelos de angiogénesis *in vitro* perfundidos, dispositivos de curación de heridas, componentes tisulares, tejidos y órganos completos, así como modelos de investigación.

#### *Fabricación de dispositivos de cultivo/perfusión*

Con referencia ahora a la FIG. 2A, a la FIG. 2B, a la FIG. 2C y a la FIG. 2D, se muestra un ejemplo esquemático de un proceso de contracción por calor conocido. Como se muestra específicamente en la FIG. 2A, cada dispositivo de cultivo/perfusión (CPD) puede comprender uno o más mandriles 2 mantenidos por un marco de soporte 12. Los mandriles 2 del diámetro del calibre deseado del vaso se ajustan con sus extremos estrechamente en los segmentos 4 de tubos de retracción de calidad médica. Los mandriles 2 pueden comprender fibras biocompatibles (por ejemplo, polímero, vidrio, hilos o equivalentes) que tienen diámetros de varios micrómetros hasta varios milímetros dependiendo del tamaño del vaso que se está emulando. En un ejemplo, se emplearon tubos microcapilares que comprenden fibras ópticas como mandriles.

Como se muestra en el dibujo más detallado de la FIG. 2B, una parte central 14 de cada segmento 4 de los tubos de contracción se contraen por calor alrededor de uno de los mandriles 2. Posteriormente, como se muestra específicamente en la FIG. 2C, el mandril 2 se retrae y se cortan los tubos. La FIG. 2D muestra la situación después de reposicionar el mandril de modo que ambos extremos del mandril estén encerrados por el nuevo segmento 4 de los tubos de contracción ahora cortados y separados. Los marcos 12 pueden fabricarse usando diversos materiales y técnicas. La configuración puede modificarse para acomodar vasos bioartificiales individuales o series de vasos bioartificiales. De forma similar, depositando varios planos de series de mandriles, puede generarse un tejido perfundible grueso con redes vasculares.

#### *Mecanización de cámaras de perfusión*

Los métodos de la invención se definen en las reivindicaciones adjuntas. Con referencia ahora a la FIG. 3A, también descrita en este documento, pero no reivindicada, se muestra una configuración conocida para la perfusión de varios ensamblajes de mandril/tubo de contracción 11. También descrito, pero no reivindicado, un marco 20 puede fresarse adecuadamente a partir de materiales de policarbonato o equivalentes. Las cámaras de distribución 30 pueden incluirse en el diseño, lo que permite la perfusión simultánea de muchos vasos bioartificiales. Los extremos de un conjunto de hebras que comprenden los mandriles 2 se reúnen en un tubo de silicio 23.



*Corte láser de marcos de Mylar*

5 Con referencia ahora a la FIG. 3B, se muestra esquemáticamente un diseño novedoso usado en un método de fabricación para montar dispositivos de cultivo/perfusión. Puede crearse ventajosamente un diseño de un único vaso, CPD 70, emparedando un mandril 2 mantenido por el tubo de contracción por calor 4 entre dos marcos 22 de Mylar® cortados por láser. Un colector epoxi cilíndrico, construido como se detalla a continuación, puede usarse ventajosamente para mantener el ensamblaje de mandril/tubo de contracción 11.

10 Los ensamblajes de mandril/tubo de contracción pueden emparedarse entre dos marcos de una película de poliéster o similar, tal como Mylar®, con los lados adhesivos presionados juntos de modo que cada mandril esté suspendido en la ventana 76 del marco por dos segmentos 4' de tubos de contracción en cada extremo. Los dos segmentos 4' de tubos de contracción se estabilizan y refuerzan por la inclusión de al menos un hilo estabilizante delgado 26 en el marco 22 y por encapsulación en colectores epoxi cilíndricos que se moldean alrededor del tubo de contracción y el al menos un hilo estabilizante delgado 26 por el uso de un molde de tubo de silicona. Los dos segmentos 4' de tubos de contracción finalmente se convertirán en los accesos de flujo entrante y de flujo saliente para el CPD 70.

20 Con referencia ahora a la FIG. 4A y a la FIG. 4B, se muestra esquemáticamente un método para la creación de colectores para dispositivos de perfusión de cultivo. La FIG. 4A muestra particularmente una pluralidad de ensamblajes de tubo de contracción/mandril 11 extraídos a través de una funda, por ejemplo, tubo de silicona 50. Un pegamento epoxi 40 se inyecta para llenar el tubo de silicona 50 y se deja endurecer.

25 La FIG. 4B muestra particularmente la condición después de que el pegamento epoxi 40 se haya endurecido y el tubo de silicona 50 se haya rasgado y retirado. Lo restante es una varilla epoxi endurecida 44. La varilla epoxi 44 se corta después de haber retraído los mandriles detrás del punto de corte dejando los canales 42 creados por el tubo de contracción. Los extremos 46 de muchos tubos de contracción pueden integrarse para formar un colector 21. El apilamiento de CPD individuales o ensamblajes de marco CPD puede usarse para crear series de vasos 3D.

*Métodos alternativos*

30 Con referencia ahora a la FIG. 5A, a la FIG. 5B y a la FIG. 5C, se muestra esquemáticamente un diseño alternativo para dispositivos de cultivo/perfusión microfabricados. La FIG. 5A muestra particularmente un conjunto de mandriles 2 introducidos a través de pequeñas perforaciones 54 en un marco donde las perforaciones tienen fundas 56, que sustituyen los tubos de contracción. La FIG. 5B muestra particularmente un CPD antes de la siembra de células incluyendo un conjunto de mandriles 2 montados en una pared 52 del marco.

35 La FIG. 5C muestra particularmente un ejemplo alternativo de un dispositivo de cultivo/perfusión con vasos 62 donde los colectores microfabricados 64 pueden adherirse a las fundas 56 en el exterior del marco 52. Los vasos 62 se cultivan sobre los mandriles como se muestra en este documento y permanecen después de haber retirado los mandriles. Los métodos de microfabricación, tales como micromoldeo, pueden usarse para la producción en masa de dichos ensamblajes de marco CPD.

*Creación y perfusión de vasos*

45 Con referencia ahora a la FIG. 6, se muestra esquemáticamente un procedimiento de siembra de células. Para preparar los CPD 70 para la siembra de células, primero se limpian y después se esterilizan con UV. En condiciones estériles, los CPD se fijan a una superficie, por ejemplo, el fondo de la placa Petri 72. La ventana interior 76 (como se muestra en la FIG. 3B) del ensamblaje de marco CPD 70 después se llena con una solución que contiene una proteína de adhesión, tal como laminina-1 y equivalentes. Puede usarse uno o más espaciadores 77 según lo necesario. Después de un periodo de incubación, la solución que contiene proteína de adhesión se retira, y después se transfiere una suspensión del tipo celular deseado (por ejemplo, células de músculo liso, células endoteliales y en algunos casos pericitos y fibroblastos, así como tipos de células precursoras incluyendo células madre) en medio de cultivo a la ventana 76 del CPD 70.

55 La siembra celular puede hacerse llenando un volumen de suspensión celular en la ventana, volteando el ensamblaje de marco CPD 70 boca abajo, creando de ese modo una gota colgante 80. Durante un periodo de incubación de aproximadamente 45 min, una gran cantidad de células se adherirá a los ensamblajes de mandril/tubo de contracción dentro del ensamblaje de marco CPD. Las células excesivas se sumergen en la punta de la gota colgante y pueden recogerse y descartarse fácilmente. La placa Petri, que contiene uno o más ensamblajes de marco CPD, después se devuelve a la posición recta, se llena con medio de cultivo hasta que los ensamblajes de marco CPD están anegados y se incuban. Las condiciones de incubación en un ejemplo fueron en un entorno de CO<sub>2</sub> al 5 % a 37 °C. Las células adheridas en los ensamblajes de mandril/tubo de contracción se propagarán y multiplicarán, formando monocapas concéntricas (por ejemplo, células endoteliales) o multicapas de 150 µm y más de grosor (por ejemplo, células de músculo liso).

65 En la configuración o grosor deseado de pared, los mandriles se extraen, creando de ese modo tubos celulares huecos. Las paredes más delgadas pueden protegerse de las roturas moldeando un gel tal como, por ejemplo,

agarosa, colágeno, un gel de proteínas de membrana basal o similares, alrededor de las fundas celulares antes de la extracción del mandril. Los colectores de los ensamblajes de marco CPD después se conectan a un sistema de perfusión y se perfunden con el fluido de elección, tal como medio de crecimiento.

- 5 En otra realización, un método para la creación de vasos precursores endoteliales a partir de células endoteliales vasculares humanas (HUVEC) comprende las etapas donde:

10 El dispositivo de cultivo se limpia primero y después se esteriliza por exposición a UV durante 30 min, desde cada lado. En condiciones estériles, el dispositivo se fija al fondo de una placa Petri con tiras estériles.

15 La ventana interior del dispositivo después se llena con una solución de proteína de adhesión de laminina-1. También pueden usarse otras proteínas de adhesión tales como fibronectina, vitronectina, fibrina, proteínas con motivo de arginina-glicina-aspartato (RGD), péptidos-RGD, gelatina, colágeno, diferentes subtipos de colágeno y equivalentes.

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

25 La placa Petri después se voltea boca abajo, creando de ese modo una gota colgante de la suspensión del medio celular en la ventana del dispositivo. Después de un periodo de incubación de 45 min en una incubadora de cultivo celular (CO<sub>2</sub> al 5 %, 37 °C) una gran cantidad de células se adherirá a los ensamblajes de mandril/tubo de contracción dentro de los dispositivos.

30 La placa Petri después se pone de nuevo en posición recta y se llena con medio de crecimiento para células endoteliales vasculares humanas hasta que el dispositivo está sumergido.

Las células no unidas a los mandriles flotarán y podrán aspirarse y descartarse.

35 La placa Petri después se coloca en una incubadora (CO<sub>2</sub> al 5 %, 37 °C). Las células adheridas a los mandriles se propagarán y multiplicarán, formando monocapas concéntricas de células endoteliales vasculares humanas.

40 El medio de cultivo después se retira de la placa Petri. Se llena una solución de colágeno en la ventana del dispositivo de cultivo y se deja solidificar, integrando de ese modo el mandril con la capa celular.

45 Las células endoteliales vasculares humanas formarán brotes en el gel de colágeno. El mandril después se extrae lentamente, dejando detrás un microvaso "precursor" perfundible de células endoteliales vasculares humanas.

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

#### *Sistema de perfusión*

55 Los CPD pueden fijarse a sistemas de perfusión en modo lineal o circulatorio. Una configuración lineal puede crearse con un sistema de flujo por gravedad o una con una bomba de jeringa disponible en el mercado o construida de forma personalizada. Las jeringas se llenan con medio de perfusión, se montan en la bomba de jeringa y se conectan a los extremos anteriores de los CPD a través de tubos estancos a gases. Los CPD pueden almacenarse en una incubadora en condiciones estériles o puede establecerse un entorno de cultivo celular estéril dentro del CPD. El colector posterior de los CPD se conecta a depósitos finales que recogen el producto de perfusión. Un sistema circulatorio puede construirse usando una bomba peristáltica. Ambos, el sistema lineal y el circulatorio pueden equiparse con dispositivos para el intercambio de gases. La concentración de gases, la presión de perfusión, el flujo, la temperatura y la concentración de nutrientes y subproductos metabólicos se miden con detectores. Los datos recogidos pueden suministrarse a un bucle de retroalimentación, permitiendo un estrecho control de los parámetros deseados.

#### **Aplicaciones específicas**

##### *Modelos para investigación relacionada con angiogénesis*

60 Con referencia ahora a la FIG. 7, la FIG. 7 muestra un esquema de una red de microvasos entre dos vasos precursores bioartificiales 200, 202. El producto de perfusión fluido 204 se vuelve a guiar a través de los capilares 206 disminuyendo el flujo (f) en el vaso precursor "venoso" 202 y aumentando la resistencia (R) en el vaso precursor "arterial" 200. Por consiguiente, el producto de perfusión 204 se dirige desde el vaso con mayor presión hasta el vaso con menor presión, simulando el flujo natural de sangre desde el extremo arterial al extremo venoso del lecho capilar. Por ejemplo, en una realización a modo de ejemplo, ambos vasos precursores se perfunden a la misma tasa

- 5 y la resistencia a la salida se mantiene igual. Si el flujo se aumenta en el primer vaso y, al mismo tiempo se disminuye el flujo en el segundo vaso, el producto de perfusión se volverá a guiar desde el primer vaso al segundo vaso. Para facilitar el desvío incluso más en otras realizaciones, la resistencia en el extremo posterior del primer vaso podría aumentarse y disminuirse en el segundo vaso. Esto podría hacerse elevando o disminuyendo la contrapresión. En una realización alternativa, el extremo posterior del primer vaso y el extremo anterior del segundo vaso estarían completamente cerrados; entonces el producto de perfusión entraría a través del primer vaso y continuaría entrando en el segundo vaso a través de la red de microvasos y abandonaría a través del extremo posterior del segundo vaso precursor de microvasos.
- 10 El método de mandril también puede usarse para el desarrollo de modelos para investigación de la angiogénesis, ensayos de adhesión de leucocitos o, según lo necesario, para ensayo farmacéutico e investigación en la reparación de heridas y enfermedades de envejecimiento, cáncer, psoriasis, retinopatía diabética, enfermedades inflamatorias, apoplejía y aterosclerosis. Usando células endoteliales solamente, o combinaciones de células endoteliales, células de músculo liso y pericitos, pueden cultivarse microvasos bioartificiales (BMV) precursores alrededor de mandriles
- 15 de diámetro micrométrico y pueden incluirse en un gel de soporte de matriz extracelular. En algunos casos, pueden usarse tipos celulares adicionales incluyendo células fibroblásticas, células progenitoras, células madre y equivalentes. Los mandriles después se extraerán, dejando detrás tubos de células endoteliales precursores dentro del gel de matriz extracelular 210. La extracción puede hacerse a mano o por la ayuda de un dispositivo automatizado, y con velocidades que varían de extremadamente lentas a extremadamente rápidas. Otras variaciones pueden incluir la extracción del mandril de los microvasos bioartificiales en un estado congelado, recubrimiento de los mandriles con un polímero termosensible o tirando de un extremo del mandril y estilizándolo de ese modo hasta su ruptura.
- 20 El brote de los vasos precursores en el gel adyacente 210 se inducirá por compuestos, tales como factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) y el éster de forbol, 12-miristato-13-acetato de forbol (PMA), que se añaden al gel y/o al producto de perfusión (por ejemplo, medio de crecimiento). Otros factores de crecimiento que pueden usarse para inducir el brote incluyen el factor de crecimiento de tipo insulina R<sup>3</sup> largo (R<sup>3</sup>IGF-1), factores de crecimiento de tipo insulina (por ejemplo, IGF-1), interleuquina-8 (IL-8) y factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF), factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), factores de crecimiento de tipo EGF de unión a heparina (HB-EGF), angiopoyetinas, factor de crecimiento placentario, citoquinas, diversas quimioquinas (por ejemplo, SDF-1 $\alpha$ ), TGF- $\beta$  y mitógenos solubles. Además, la densidad de siembra de las células contribuye a la inducción de un fenotipo competente en brote.
- 25 Las redes de microvasos complejas 222 pueden crearse estableciendo una diferencia de presión entre dos microvasos bioartificiales precursores adyacentes, imitando de ese modo el flujo de sangre arterial y venosa. El flujo de fluido entonces se redireccionará desde el microvaso bioartificial "arterial" a través de los brotes interconectados en el microvaso bioartificial "venoso".
- 30 El producto de perfusión puede comprender ventajosamente medio de crecimiento celular oxigenado, libre de suero y sustancias angiogénicas y angioestáticas. En otro ejemplo, el producto de perfusión puede ser un medio de crecimiento celular oxigenado, suplementado con suero y/o compuestos que influyen en la angiogénesis. En otra realización a modo de ejemplo más, el producto de perfusión puede ser una solución de sal fisiológica oxigenada. En algunos casos, el medio está tamponado para intervalos fisiológicos. En otro ejemplo, el producto de perfusión puede incluir sangre oxigenada, componentes de la sangre o sustitutos de la sangre. En otra realización a modo de ejemplo más el producto de perfusión puede no estar oxigenado, y la oxigenación del sistema se consigue por difusión a través de la matriz. En otra realización a modo de ejemplo más, pueden añadirse compuestos angiogénicos o angioestáticos a un producto de perfusión.
- 35 En una realización a modo de ejemplo, los compuestos angiogénicos y angiostáticos o similares se añaden a la matriz. En otra realización a modo de ejemplo más las células comprenden células modificadas genéticamente que liberan productos al producto de perfusión o a la matriz. En otra realización a modo de ejemplo más, la matriz puede comprender ventajosamente fibrina, colágeno, matrices de membrana basal, componentes de matriz extracelular y gelatina. Un tipo de matriz útil es gel Matrigel®. En otra realización a modo de ejemplo, la matriz puede comprender agar, agarosa, alginato o gel de sílice.
- 40 En otra realización a modo de ejemplo, la matriz basada en membrana basal puede incluir colágeno de tipo IV, perlecano, laminina, integrinas, enactinas, distroglicanos, fibras de colágeno de tipo VII y microfibrillas de colágeno de tipo VII. En otra realización más, la matriz de base celular puede incluir proteoglicanos, glucosaminoglicanos, proteoglicanos de sulfato de heparina, proteoglicanos de sulfato de condroitina, proteoglicanos de sulfato de queratina, ácido hialurónico, colágeno, fibronectina, vitronectina, elastina y laminina.
- 45 En los métodos descritos en las reivindicaciones adjuntas, las células son células endoteliales. También descrito en este documento, pero no reivindicado, las células pueden seleccionarse del grupo que consiste en células endoteliales, células de músculo liso, pericitos, células fibroblásticas, células progenitoras, células madre, células musculares, células hepáticas, células pulmonares, células cutáneas, células epiteliales, células humanas, células animales, células vegetales, células eucariotas, células modificadas por ingeniería genética, células modificadas

genéticamente, células enfermas, células infectadas por virus y células cancerosas. Asimismo, la matriz puede poblarse con células seleccionadas del grupo que consiste en células endoteliales, células de músculo liso, pericitos, células fibroblásticas, células progenitoras, células madre, células musculares, células hepáticas, células pulmonares, células cutáneas, células epiteliales, células humanas, células animales, células vegetales, células eucariotas, células modificadas por ingeniería genética, células modificadas genéticamente, células enfermas, células infectadas por virus y células cancerosas, dispersadas por toda la matriz o concentradas localmente. En algunos casos, se incluye un fragmento de tejido sano o enfermo, tal como tejido canceroso en la matriz. En otros casos, se incluye tejido infectado por virus o modificado por ingeniería genética en la matriz.

El brote desde vasos precursores puede estudiarse microscópicamente *in vitro*, en material seccionado o en preparaciones de montaje completo. La perfusión de los microvasos bioartificiales con soluciones fluorescentes (por ejemplo, dextranos fluorescentes) ayuda al análisis del diámetro del brote, la permeabilidad de lúmenes de brotes y el grado de anastomosado. La reconstrucción 3D de las morfologías de los brotes puede realizarse por apilamiento en el eje z de imágenes de epifluorescencia tomadas por un microscopio confocal. La síntesis de la matriz de membrana basal pericelular por los brotes 220 puede controlarse en montajes completos y en secciones histológicas (de parafina) por inmunomarcaje con anticuerpos primarios antilaminina y colágeno de tipo IV y anticuerpos secundarios marcados con fluorescencia o peroxidasa.

En brotes de EC/SMC compuestos, las relaciones espaciales entre los dos tipos celulares puede examinarse marcando las células endoteliales con un anticuerpo monoclonal (MAb)-FITC contra CD31 humana (clon P2B1 - Chemicon) o aglutinina UEA 1-FITC - un marcador específico para células endoteliales humanas, las células de músculo liso pueden marcarse con un MAb contra alfa-SM actina humana seguido por anticuerpos secundarios antirratón FITC. Los detalles de la estructura luminal y la interacción entre las células endoteliales y las células de músculo liso pueden obtenerse de secciones de parafina marcadas con los reactivos mencionados anteriormente.

Los métodos de fabricación descritos son la base para la producción en masa comercial de dispositivos de angiogénesis con una alta repetibilidad. Con una conservación adecuada (por ejemplo, criopreservación), podría haber vasos precursores precultivados o redes de microvasos completas disponible para los investigadores listos para su uso.

#### *Sustitutos de arteria coronaria*

Para la creación de sustitutos de arteria coronaria, se seleccionan mandriles con un diámetro exterior para producir un sustituto de arteria coronaria que tiene un lumen de vaso con un diámetro interior de aproximadamente 4 mm a 5,5 mm. Como alternativa, el mandril puede ser un tubo hueco que se perfunde y es suficientemente permeable para permitir el intercambio de nutrientes y gases durante el periodo de crecimiento del sustituto de arteria coronaria. Los sustitutos de arteria coronaria pueden cultivarse únicamente a partir de células de músculo liso, presentando de ese modo una estructura análoga a la capa de medio en vasos sanguíneos, o puede prepararse como estructuras compuestas a partir de dos o tres tipos celulares.

En los métodos descritos en las reivindicaciones adjuntas, las células son células endoteliales. También descrito en este documento, pero no reivindicado, es un método en que se siembran células de músculo liso en los mandriles y se cultivan hasta capas circulares de 300-500  $\mu\text{m}$ . Para acelerar la creación de sustitutos de arteria coronaria, el fenotipo SMC puede manipularse de tal modo que las células sean llevadas a un fenotipo altamente proliferativo durante la fase de crecimiento inicial, y después se cambian a un estado diferenciado después de que la pared del vaso haya alcanzado el grosor deseado. El cambio de fenotipo causará que las células de músculo liso ralenticen drásticamente su tasa de crecimiento, e inducen la producción de proteínas de la matriz extracelular, tal como colágeno y elastina, que afectan a las propiedades mecánicas de los vasos. El cambio de fenotipo puede conseguirse controlando la expresión de ciertos genes. Por ejemplo, con la ayuda de un promotor sensible a tetraciclina, puede suprimirse la expresión génica (por ejemplo, para elastina) hasta que la pared del vaso haya alcanzado el grosor deseado (Clontech Laboratories Inc.). Omitir la tetraciclina del medio de crecimiento entonces activará el gen insertado. La sobreexpresión de elastina, por ejemplo, inhibirá la proliferación celular adicional y ejercerá funciones estructurales y de señalización dentro de la pared del vaso. Puede usarse acondicionamiento mecánico, por ejemplo, flujo pulsátil para reforzar los sustitutos de arteria coronaria, e inducir la alineación fisiológica de las células.

También pueden usarse potencialmente otros "cambios de fenotipo" externos o internos. Por ejemplo, pueden modificarse por ingeniería genes específicos endoteliales o de músculo liso u otros candidatos a través de técnicas de ADN recombinante para expresarse a través de promotores inducibles y heterólogos específicos de célula o tejido nativos. Adicionalmente, los sistemas de transducción lentivíricos avanzados proporcionan la capacidad de integrar un gen de interés bajo el control transcripcional de un promotor deseado en tipos de células quiescentes u otros tipos de células (Clontech Laboratories Inc., Invitrogen Corp.). Estos métodos permiten la manipulación de la dosificación génica, los niveles de expresión, el análisis mutacional y la regulación, todos los cuales permiten el control de los cambios fenotípicos celulares.

Las células endoteliales pueden sembrarse en las fundas de SMC directamente después de la retirada del mandril o

después del acondicionamiento y restructuración de las células de músculo liso. La siembra de células endoteliales puede hacerse por infusión de una suspensión de células endoteliales en la funda de SMC. El flujo después se detiene durante un periodo de tiempo para permitir la adhesión apropiada de las células endoteliales. Si fuera necesario, los vasos pueden rotarse o voltearse repetidamente boca abajo para facilitar una distribución uniforme de las células endoteliales.

Como alternativa, las células endoteliales pueden sembrarse en el mandril en primer lugar. En ese caso, las células de músculo liso se siembran en una capa de células endoteliales confluyente. Por este método, será necesario evitar que las células endoteliales migren hacia la periferia del sustituto de arteria coronaria, que es más rica en oxígeno y nutrientes.

Si se desea, la siembra de células fibroblásticas en el exterior de las fundas de SMC puede crear una capa adventicia. En algunos casos, la siembra de pericitos se incluye para el crecimiento de los vasos donde pueden contribuir a la formación de la membrana basal. En otros casos, la siembra de células progenitoras y/o madre también se incluye para el crecimiento de los vasos.

Las células para crear sustitutos de arteria coronaria pueden obtenerse de material autólogo, heterólogo o xenogénico. Las células pueden ser células madre, células precursoras o células diferenciadas. Las células pueden modificarse genéticamente para conseguir un fenotipo específico o para disminuir la respuesta inmunitaria del organismo hospedador.

El método de CPD descrito en este documento proporciona la opción para la producción en masa de sustitutos de vasos o sustitutos de vasos listos para su uso que se diseñan de forma personalizada para el destinatario. El método de CPD descrito en este documento también es adecuado para el desarrollo de modelos para ingeniería tisular de sustitutos de arteria coronaria, para investigación en la aterogénesis, arteriogénesis, para la investigación en la interacción de diferentes tipos de células vasculares entre sí y con componentes de la matriz extracelular, para estudios sobre los efectos del óxido nítrico y para el estudio de diversos agentes farmacéuticos.

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

El método de CPD descrito en este documento puede usarse para crear vasos sanguíneos de diámetro y tipo diferente al de las arterias coronarias. El cambio del diámetro del mandril variará el diámetro del vaso. En algunos casos, el mandril puede ser de aproximadamente 20 micrómetros a aproximadamente 500 micrómetros que se aproxima al tamaño de los vasos más pequeños. En otros casos, el mandril puede ser de aproximadamente 200 micrómetros a aproximadamente 5,5 mm que se aproxima al tamaño medio de los vasos más grandes. El tipo del vaso (por ejemplo, arterial, venoso, linfático) puede variarse con el fenotipo de las células y/o el punto temporal en que se inhibe la proliferación de las células. Las venas, por ejemplo, contienen solamente una pequeña capa de células de músculo liso.

#### *Otros tejidos de tipo tubular*

El método de CPD descrito en este documento puede usarse para el diseño por ingeniería de otros tejidos tubulares, tales como el conducto biliar, el conducto lagrimal, el tubo faringotimpico, el oviducto, el vaso deferente, el uréter, la uretra, las vías respiratorias pulmonares, etc. El método de CPD descrito en este documento también puede mostrar utilidad para la generación de conductos nerviosos de diferentes tipos celulares, incluyendo células de la glía, para guía del crecimiento y la reparación neural.

#### *Sistemas BAV para tejidos diseñados por ingeniería*

El método de CPD descrito en este documento puede usarse para el diseño de tejidos y órganos usando series de mandriles extraíbles como estructura. Las células del tejido/órgano deseado (músculo, hígado, riñón, pulmón, piel, etc.) se siembran en los mandriles recubiertos con proteína de adhesión. Estos mandriles pueden prepararse a partir de fibras sólidas o hilos o, como alternativa, a partir de tubos permeables perfundibles, tales como celulosa. Los mandriles se separan entre sí en un espaciado preciso que permite que surjan fundas de células individuales. Con este método, pueden formarse láminas o bloques de tejido. Los mandriles después se extraen (o se retiran de forma diferente) y el tejido bioartificial se perfunde de forma interna por la ayuda de un sistema de perfusión.

#### *Dispositivo de curación de heridas*

Los sistemas de vasos bioartificiales prefabricados pueden usarse para ayudar en la curación de heridas, tal como para úlceras crónicas en pacientes diabéticos. Las redes de microvasos bioartificiales podrían incluirse en parches de materiales de soporte (por ejemplo, de geles de matriz extracelular, enriquecidos con factores de crecimiento angiogénico) y colocarse en la herida. Perfundido de forma autónoma con soluciones de nutrientes oxigenadas, el vaso bioartificial facilitaría el brote de la vasculatura y la piel del donante. Como alternativa, dicho parche de vaso bioartificial podría emparedarse entre la herida y un injerto de piel, y facilitar el crecimiento del injerto.

*Dispositivo de terapia génica*

Los vasos bioartificiales podrían usarse para dispositivos implantables de suministro de fármacos. Las células, tomadas de un paciente podrían modificarse genéticamente *in vitro* para producir una cierta proteína (hormona, enzima, etc.). Estas células después pueden crecer en vasos bioartificiales o redes vasculares, usando el método mencionado anteriormente. Reimplantadas en el hospedador, las células continúan produciendo la sustancia diana y liberándola local o sistémicamente.

*Tejidos y órganos artificiales*

Las redes vasculares diseñadas por ingeniería tisular, como se describe anteriormente, pueden usarse para la creación de tejidos o incluso órganos completos. Un enfoque es la creación de uno o más vasos precursores perfundidos *in vitro*. Las células parenquimáticas, del tejido u órgano deseado se siembran alrededor de los vasos precursores, como por ejemplo, en un gel. Pueden añadirse también diferentes tipos de células estromáticas (por ejemplo, células inmunitarias, células inflamatorias, pericitos, fibroblastos o células endoteliales). Las células parenquimáticas se abastecen con nutrientes y oxígeno a través de los vasos precursores. La multiplicación de las células parenquimáticas aumenta la demanda de nutrientes y oxígeno. Las células liberan factores angiogénicos y estimulan el brote de los vasos. El sistema de vasos brota a la misma tasa que crece el tejido - muy similar al crecimiento natural. Por lo tanto, este sistema también sería un buen modelo para estudios en biología del desarrollo.

Otro enfoque utiliza series paralelas de mandriles como una estructura para células parenquimáticas. Según se multiplican las células parenquimáticas, se forman capas de células alrededor de los mandriles. Finalmente, el espacio entre todos los mandriles se llena con células parenquimáticas, produciendo una lámina de tejido. Tras la retirada de los mandriles, el tejido puede perfundirse a través de los canales, dejados por los mandriles. Esos canales pueden quedar endotelializados a través de siembra luminal. El enfoque no está limitado a 2D. Pueden apilarse varias láminas o pueden usarse estructuras 3D. El inventor de este documento ha usado series 2D así como series 3D para la ingeniería de tejido muscular.

En otro enfoque más, podrían crearse capas de tejido y capas de redes vasculares independientemente, y después apilarse intermitentemente. Todos estos enfoques pueden producir modelos simples con uno o dos tipos celulares, o en su lugar construcciones complejas compuestas de varios tipos celulares.

Tras el implante, los tejidos u órganos, modificados por ingeniería con estos métodos podrían conectarse directamente a los torrentes sanguíneos, o mantenerse perfundidos por un sistema de perfusión hasta que la vasculatura hospedadora haya crecido en el injerto.

**Ejemplo de construcción de músculo diseñado por ingeniería tisular perfundida**

Con referencia ahora a la FIG. 8a, se muestra una imagen *in vitro* de un ejemplo de una pluralidad de mandriles después de la siembra con células de músculo liso. Los métodos descritos en las reivindicaciones adjuntas, las células son células endoteliales. También descrito en este documento, pero no reivindicado, es un método en que una pluralidad de unidades M de mandril y tubo de contracción se emparejó en un marco de Mylar®. La distancia entre los mandriles M se ajustó hasta aproximadamente 100 µm. Los extremos de todos los segmentos de tubo de contracción se combinaron en un colector anterior y uno posterior (no mostrados). El marco de Mylar se esterilizó, se recubrió con laminina y se sembró con una suspensión de 5 x 10<sup>6</sup> células SM de músculo liso aórtico de rata (RASMC)/ml. Las células SM se adhirieron a cada mandril individual M y se multiplicaron, formando de ese modo capas circulares. Después de 10 días, las capas individuales habían surgido y producido una lámina gruesa o placa de células de músculo liso. Después de 7 días adicionales en medio de crecimiento, el medio se suplementó con 50 U/ml de heparina durante otros 7 días. Después, todos los mandriles se extrajeron y el tejido se perfundió con medio de heparina a una tasa de 10 ml/día. La cámara de perfusión se mantuvo fija en el fondo de una placa Petri de 100 mm llena con medio de heparina. La placa de SMC se perfundió durante 11 días. Durante ese tiempo, los canales CH permanecieron funcionales y permanecieron claramente visibles *in vitro* (como se muestra mejor en la Fig. 8b).

Con referencia ahora a la FIG. 8b, se muestra un ejemplo de una placa MP de músculo perfundido. Se muestra fluido perfundido a través de los extremos de los tubos (T) en los canales (CH) dejados por los mandriles extraídos.

Con referencia ahora a la FIG. 9, se muestra esquemáticamente una realización alternativa de un CPD. En el ejemplo, un CPD 900 incluye una capa 902 yuxtapuesta entre un primer portaobjetos de vidrio 904 y un segundo portaobjetos de vidrio 920. La capa 902 tiene un grosor adecuado para incluir una pluralidad de accesos de fluido conectados por los canales 922. La pluralidad de accesos de fluido incluye un acceso de suspensión celular 914, una pluralidad de accesos de entrada 912 y una pluralidad de accesos de salida 918. Los accesos que están conectados por los canales 922 para permitir el paso y el intercambio de fluidos funcionan de forma similar. Hay múltiples accesos, tales como los accesos 912, dispuestos para proporcionar múltiples puntos de acceso. Otras aplicaciones pueden emplear ventajosamente diseños de microfluidos con cámaras de fluidos y accesos creados en materiales microfluidos. Asimismo, la capa puede comprender silicona u otros materiales adecuados para su uso en

microscopía de aplicaciones de microfluidos. Una cámara de colágeno 906 está localizada ventajosamente para su acceso por un par de tubos capilares 916 de vidrio flexible huecos, o equivalentes. El número de tubos capilares empleado puede variar desde uno hasta sustancialmente más de dos, según se puedan acomodar por el tamaño del CPD y el número de vasos que se está creando. A cada uno de la pluralidad de accesos y cámaras se puede acceder a través de la capa por una o más bombas de jeringa a través de las entradas de los tubos 940A, 940B, donde las bombas de jeringa se unen a jeringas que tienen agujas. Aunque se muestran solamente dos entradas de tubo de bomba de jeringa 940A, 940B para simplificar los dibujos, se entenderá que pueden usarse diferentes bombas de jeringa, jeringas o equivalentes para inyectar o extraer material en cada cámara y/o acceso según pueda ser el caso. En una realización, las bombas de jeringa se acoplan a jeringas estancas a gases.

Haber descrito las características del CPD 900 alternativo, ayudará a comprender la descripción para describir ahora un método para construir el CPD. En un ejemplo que emplea una capa de silicona para la capa 902, se perfora un patrón de orificios y canales en una capa de silicona cubierta con una capa superior adhesiva 943 y capa inferior adhesiva 945. Después, se perforan las agujas huecas a través de la silicona, que después se usan para guiar los capilares de sílice fusionados 916 recubiertos con poliimida en la cámara de colágeno 906 y también en uno de los accesos de entrada 912. Los dos tubos capilares se mantienen por tubos de orificio pequeño 910, que conducen desde la cámara principal a los accesos de salida 908. La capa de silicona 902 después se empareda entre dos portaobjetos de vidrio con la ayuda de las capas adhesivas. El CPD 900 después se somete a autoclave y se almacena hasta su uso. Para obtener la cámara 906 lista para la creación de vasos, se prepara una solución de colágeno, se inyecta a través de una aguja de jeringa directamente en la cámara de colágeno 906 y se deja gelificar en una incubadora durante una noche. El CPD 900 después se conecta a una bomba de jeringa inyectando agujas de jeringa en los dos accesos de entrada.

Las agujas de jeringa se conectan, a su vez, a los tubos estancos a gases, que conducen a dos jeringas estancas a gases, llenas con medio de crecimiento con un pH bien ajustado y montadas en una bomba de jeringa. Los dos accesos de salida 908A, 908B, se conectan a depósitos de residuos de un modo similar. Las bombas de jeringa, funcionando aquí como bombas de perfusión, se activan entonces, llenando de ese modo los accesos de entrada y cebando secuencialmente los accesos de entrada, los tubos capilares y los accesos de salida. Cuando todo el aire se ha expulsado del sistema, cada tubo capilar se agarra con pinzas y los extremos que alcanzan la cámara de colágeno se extraen de nuevo a través del gel de colágeno hasta que solamente los extremos de los capilares alcanzan la cámara de matriz. Con este procedimiento, se crean dos canales perfundibles en el gel de colágeno. Para sembrar células en los canales de colágeno, se inyecta una suspensión altamente concentrada de células endoteliales en los accesos para la suspensión celular. La bomba de jeringa se inactiva y los otros extremos de los capilares entonces se extraen de nuevo a los depósitos pequeños 914R que contienen las células, conduciendo a un flujo de entrada de gran cantidad de células en los canales de colágeno. El caudal de las células puede controlarse estrechamente a través de la altura de los depósitos de residuos. En algunos casos, el caudal puede regularse para que se aproxime al flujo *in vivo* en capilares y vasos nativos. El CPD entonces se coloca en una incubadora durante 45 min para permitir que las células se adhieran a las paredes de los canales de colágeno. El CPD puede volcarse varias veces o manipularse de otro modo para distribuir las células de forma óptima. Finalmente, los tubos capilares se retiran de los depósitos de células en depósitos que son parte del acceso de entrada y la bomba de jeringa se activa y se ajusta a la tasa de perfusión deseada. Se retiran por lavado las células excesivas. Este procedimiento de siembra conduce a dos vasos precursores con monocapas homogéneas de células después de permitir un tiempo para el crecimiento, donde el tiempo necesario es más corto para cantidades más altamente concentradas de células inyectadas en los tubos. Obsérvese que el mandril puede retirarse de la matriz por extracción y/o descomposición, dependiendo del tipo de mandril usado.

Con referencia ahora a la FIG. 10, se muestra un único vaso precursor 1050 creciendo brotes 1052 en una matriz adyacente 1054. Cuando se siembran células de vena de cordón umbilical humano (HUVEC) en los canales de colágeno, los vasos precursores así creados empiezan a brotar en el colágeno. Estos brotes se alargan y empiezan a ramificarse. Estas ramificaciones finalmente anastomosan con ramificaciones desde el vaso precursor opuesto y, por tanto, forman redes vasculares.

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

#### **Protocolo para la creación de vasos precursores**

Con referencia ahora a la FIG. 12, se muestra un método alternativo para crear células precursoras sembrando canales en una matriz de colágeno. Habiendo descrito el CPD alternativo usando una capa de silicona, ahora se describirá un ejemplo específico de una aplicación para crear un sistema de microvasos para facilitar la comprensión de la descripción por los expertos en la materia.

El CPD se esteriliza en una autoclave y se mantiene en un entorno estéril hasta su uso. Se prepara una solución de colágeno y se mantiene en hielo. El colágeno se llena en una pequeña jeringa. La jeringa se equipa con una aguja de jeringa 30G y la solución de colágeno se inyecta en la cámara de colágeno a través de la aguja de jeringa hasta que la cámara está completamente llena con colágeno 1002. Se inyecta una segunda aguja de jeringa desde el lado

opuesto de la cámara como una salida de aire.

El CPD entonces se conecta a una bomba de jeringa inyectando agujas de jeringa en los dos accesos de entrada 1004. Las agujas de jeringa se conectan, a su vez, a tubos estancos a gases, que conducen a dos jeringas estancas a gases, llenas con medio de crecimiento con el pH bien ajustado, y se montan en la bomba de jeringa. Los dos accesos de salida se conectan a recipientes de residuos de un modo similar (es decir, agujas de jeringa inyectadas en los accesos de salida, sin tubos que conduzcan a los recipientes de residuos) 1006.

El CPD se perfunde haciendo funcionar la bomba de jeringa como una bomba de perfusión, llenando de ese modo los accesos de entrada y cebando secuencialmente los accesos de entrada, los tubos capilares y los accesos de salida 1008. Cuando todo el aire se ha expulsado del sistema (por ejemplo, a través de agujas de jeringa de pequeño diámetro que sirven como salidas de aire extraíbles), entonces cada tubo capilar se agarra con pinzas y los extremos que alcanzan la cámara de colágeno se extraen de nuevo a través del gel de colágeno hasta que solamente los extremos de los capilares alcanzan la cámara. Con este procedimiento, se crean dos canales perfundibles en el gel de colágeno 1010.

Para sembrar células en los canales de colágeno, se inyecta una suspensión altamente concentrada de células endoteliales en los accesos para la suspensión celular 1012. La bomba de jeringa entonces se inactiva y los otros extremos de los tubos capilares se extraen entonces de nuevo desde los accesos de entrada a los depósitos pequeños que contienen las células, conduciendo a un flujo entrante inmediato de grandes cantidades de células a través de los tubos capilares en los canales de colágeno 1014. El caudal de las células puede controlarse estrechamente a través de la contrapresión (altura de los depósitos de residuos). Los capilares entonces se extraen de nuevo adicionalmente en los depósitos que están conectados a los accesos de entrada.

El CPD entonces se coloca en una incubadora durante 45 min para permitir que las células se adhieran a las paredes de los canales de colágeno 1016. El CPD puede volcarse varias veces o manipularse de otro modo para distribuir las células de forma óptima.

Finalmente, la bomba de jeringa se activa y se ajusta a una tasa deseada de perfusión 1020. Las células excesivas se retiran por lavado. Este procedimiento de siembra conduce a dos vasos precursores con monocapas homogéneas de células 1022. Puede crearse una o más redes de microvasos perfundiendo los vasos precursores como se describe anteriormente.

Como alternativa, el procedimiento para crear los vasos precursores también puede incluir la inclusión de mandriles en la matriz de colágeno, la extracción de los mandriles y la infusión de células en los canales dejados por los mandriles, así como la siembra de células en los mandriles como se describe anteriormente con referencia a la FIG. 1A-1C y otras. La combinación de los dos métodos permite estratificar diferentes tipos de células.

#### **Protocolo para activar un fenotipo competente de brote**

En otro método a modo de ejemplo, la siembra de tipos celulares a altas densidades activa la competencia de las células para el brote como microvasos desde vasos precursores. El proceso se realiza como se analiza previamente con el CPD 900 salvo que se indique de otro modo. Las imágenes presentadas a continuación se toman a través de microscopía de campo brillante o microscopía fluorescente confocal usando técnicas y reactivos convencionales. Las características específicas para la activación del fenotipo de competencia de brote se distinguen para ayudar a la comprensión de la descripción por los expertos en la materia.

Con referencia a la FIG. 13A, se describe un método para formar células competentes en brote y vasos precursores. Se siembran tipos celulares tales como células endoteliales umbilicales humanas (HUVEC) a altas densidades 1300 donde la mayoría de las células están en contacto directo o casi en contacto con las células adyacentes en el espacio 3D del canal. Un subconjunto de células está en contacto con la matriz de la pared del canal.

La siembra a alta densidad activa una competencia para el brote en las células 1304. Sin limitarse a una teoría particular, se cree que este fenotipo es a partir de los contactos entre células que están presentes cuando las células se siembran a una alta densidad que activa la señalización celular inducida desde contactos homófilos entre las células 1308. También se esperaría que las interacciones heterotípicas entre diferentes tipos de células también pudieran contribuir a activar el fenotipo competente de brote.

Adicionalmente, los contactos entre las células y los componentes de la matriz de la pared del canal pueden contribuir a la activación de la competencia de brote 1312. Además, hay contribuciones a la activación de la competencia de brote a partir de contactos de factores de crecimiento solubles 1316 con las células. Por ejemplo, los factores de crecimiento presentes en el medio de perfusión, demostraron previamente inducir el brote (como se muestra en la FIG. 7, por ejemplo). También puede haber contribuciones de la detección mecánica del flujo de perfusión por las células durante la siembra y la perfusión de las células 1320.



Los eventos de transducción de señales celulares probablemente activan el estado competente de brote 1304 observado para las células. Cuando las células se perfunden en los canales de la matriz crecen o provienen de migración celular formando vasos precursores 1324 con lúmenes continuos. Los vasos precursores se perfunden e incuban para la viabilidad y para el brote de microvasos en la matriz 1328. El desencadenante para el fenotipo de competencia de brote inicialmente parece ser un fenómeno relacionado con la densidad de siembra, pero el análisis en curso delinear si este fenotipo puede regularse adicionalmente. El crecimiento adicional conduce a la formación de redes de microvasos 3D complejas 1332. En algunas realizaciones, las redes de microvasos de diferentes vasos precursores surgen a través de anastomosis.

Sin limitarse a una teoría particular, una hipótesis es que el fenotipo de competencia de brote se obtiene de la suma de contactos que median la señalización celular que depende de la densidad de siembra. Adicionalmente, la contribución de las fuerzas físicas procedentes de la siembra a alta densidad puede evaluarse para el fenotipo de competencia de brote. Por ejemplo, la siembra de células endoteliales a alta densidad provoca la compresión física donde las células endoteliales se apelotonan durante el proceso. Como las células endoteliales normalmente se propagan lateralmente en la formación de los vasos, esto inicialmente no es posible durante la siembra donde las células están estrechamente compactadas juntas y el crecimiento en la matriz puede favorecerse desencadenando el fenotipo de brote.

Con referencia ahora a la FIG. 13B, se muestra un dispositivo de perfusión celular alternativo CPD 1350. El CPD 1350 proporciona una perfusión continua a largo plazo teniendo un único acceso de fluido de entrada 1354 y un único acceso de fluido de salida 1392 para potenciar el funcionamiento y la eficacia de la perfusión. Se sella una capa de silicona 1366 dentro de un primer portaobjetos 1370 y un segundo portaobjetos 1374 usando plasma de oxígeno indicado por el precinto 1362. El sello resultante 1362 es estanco al agua bajo la presión que puede generarse por perfusión a largo plazo.

El único acceso de fluido de entrada 1354 permite cebar y sembrar células a altas densidades a través de inyección en una cámara de cebado 1378. Se acopla un conducto 1382 a un mandril capilar de vidrio 1384 dentro de una cámara de matriz de colágeno 1390. El colágeno puede inyectarse en la cámara de matriz 1390 alrededor de un mandril capilar de vidrio 1384 formando la matriz en la cámara de colágeno 1390. La retirada del mandril capilar de vidrio 1384 a través del conducto 1382 proporciona un canal 1388 dentro de la matriz de colágeno. El flujo de un medio de perfusión 1394 prosigue al acceso de entrada de fluido 1354 a través del conducto 1382 hasta el canal 1388 a través de la cámara de matriz 1390 y hasta una segunda cámara de cebado 1378 hasta el acceso de salida 1392 y hasta un depósito de residuos 1396. Puede haber más de un canal presente en los CPD a modo de ejemplo alternativos.

Con referencia ahora a la FIG. 13C a la FIG. 13E, se representa esquemáticamente la siembra del CPD. En la FIG. 13C se representa esquemáticamente una vista superior del CPD alternativo 1350. Obsérvese que la orientación es opuesta a la de la FIG. 13B. El CPD 1350 se muestra con el mandril 1384 dentro de la cámara de matriz 1390 que puede estar llena de colágeno. El CPD contiene una capa de silicona 1366 que está sellada con plasma de oxígeno entre los dos portaobjetos de vidrio 1370/1374. Con referencia ahora a la FIG. 13D, se inyecta colágeno 1391 o matriz equivalente a la cámara de matriz 1390 y se deja gelificar alrededor del mandril 1384. El mandril se retira a través del conducto 1382 dejando un canal 1388. Se siembran células 1 (por ejemplo, HUVEC y otros tipos celulares) a alta densidad en un medio de perfusión 1394. Las células pueden inyectarse por un medio adecuado, por ejemplo, por una jeringa.

El flujo de perfusión se mantiene mediante una bomba o un dispositivo equivalente que mueve las células 1 en el canal 1388 donde el flujo se detiene brevemente durante aproximadamente 45 min, lo que permite que las células se adhieran a la pared del canal. El crecimiento mediante una incubadora o un dispositivo equivalente conduce a la formación de un vaso precursor de brote dentro del canal (no representado). Con referencia ahora a la FIG. 13E, el CPD 1350 se muestra configurado una vez reanudada la perfusión a través de las células 1 que forman el vaso precursor. Aquí, el acceso de entrada 1354 se muestra en la parte inferior en el mismo lado del CPD que el acceso de salida 1396, lo que facilita la manipulación del dispositivo, pero la localización observada a la derecha en la FIG. 13C y en la FIG. 13D también es similarmente funcional. El medio de incubación permite adicionalmente el crecimiento de microvasos de brote hasta que los microvasos han formado redes.

Los siguientes ejemplos se realizaron usando un CPD (por ejemplo, CPD 1350), dispositivo equivalente o se muestran esquemáticamente. Con referencia ahora conjuntamente a la FIG. 14A, a la FIG. 14B y a la FIG. 14C, se muestra esquemáticamente un método de siembra de alta densidad para un canal de matriz. En la FIG. 14A, se representa un ejemplo de una matriz de colágeno 1400 junto con un canal 1404. El diámetro del canal puede hacerse a cualquier tamaño deseable para el estudio de la angiogénesis o crecimiento de vasos. Las células 1408, tales como células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), en solitario o mezcladas con otros tipos celulares (por ejemplo, SMC, pericitos, fibroblastos y precursores) se siembran a una alta densidad en el canal a un caudal específico en un medio de perfusión 1412. En algunas realizaciones a modo de ejemplo, hay células endoteliales o equivalentes presentes de un mínimo de alta densidad de aproximadamente 250 células hasta un máximo de aproximadamente 2000 células por mm cuadrado dado un tamaño celular promedio medido de aproximadamente 18,0 micrómetros de diámetro y un factor de corrección sistemático de aproximadamente 2,5. Las

células, por tanto, se concentran altamente y muestran características de flujo reducido. El caudal del medio de perfusión 1412 se ajusta desde una bomba de jeringa o desde un dispositivo equivalente y puede ajustarse para proporcionar un caudal y una presión específicos para un canal dado. En ciertas realizaciones, se usa un caudal de 2 microlitros/min que corresponde a una tensión de corte de  $1,2 \text{ dyn/cm}^2$ . Los valores de tensión de corte de  $0,75$  a  $30 \text{ dyn/cm}^2$  se han informado como fisiológicos y representan realizaciones adicionales. En otras realizaciones, el caudal también podría ajustarse para crear tensiones de corte fuera de los límites normales para crear condiciones patológicas.

En la FIG. 14B, para algunas realizaciones a modo de ejemplo, la concentración es suficientemente alta de modo que el flujo de las células dentro del canal se reduce significativamente o se detiene como un tapón de origen natural 1420 al caudal dado 1424. En muchos casos, el tapón de células es temporal y se resuelve sin un aumento en el caudal o en la presión. En otros casos, el caudal y la presión pueden aumentarse para retirar el tapón de células. En ciertos ejemplos, el flujo de células se detiene en el tapón 1420 durante aproximadamente uno o dos segundos y después se reanuda 1425 sin ajustar el caudal de la bomba. En otros ejemplos, el caudal se aumentó ligeramente justo antes o después de formarse un tapón de células. En realizaciones representativas, el flujo entonces se interrumpía inactivando la bomba durante aproximadamente 30 a aproximadamente 45 minutos permitiendo que las células se adhirieran a la pared del canal. Se reconoce que la concentración de células, cuando se siembran a alta densidad, es suficientemente elevada para que el flujo de las células se reduzca.

Además, es evidente que las tensiones físicas actúan sobre las células del flujo de perfusión y la presión, así como de los contactos entre las células y de los contactos entre las células y la pared del canal. Estas fuerzas físicas actúan como estímulos y tensión sobre las células y son particularmente evidentes cuando se forma un tapón de células parando el flujo brevemente. Los estímulos físicos de agregación pueden alterarse, aumentarse o disminuirse, basándose en cambios en la concentración celular, la presión y el caudal. Aunque se cree que el fenotipo de brote *in vivo* está mediado a través de un mecanismo relacionado con la alta densidad de siembra, en algunos casos la viscosidad del medio de perfusión podría aumentarse para conferir efectos adicionales de tensión física. Dichos estímulos de agregación se cree que contribuyen a o inician los eventos celulares que median la activación del fenotipo de brote. Además, parece que la presión de perfusión afecta a la tasa de crecimiento y a la maduración de los brotes en el tiempo. Debe observarse que el brote *in vivo* no depende de una densidad de siembra o de las células que están en una forma esférica. El brote *in vivo* no sucede a partir de células aplanadas y no depende de la densidad celular. Se esperaría que el conjunto correcto de factores angiogénicos, ECM y producto de perfusión estimulara las células endoteliales planas normales o equivalentes a brotar en nuestro modelo *in vitro* de forma similar a lo que se observa *in vivo*.

Con referencia ahora a la FIG. 14C, se representa una vista lateral a través del canal. Después de la incubación para permitir que las células se adhirieran a la pared del canal 1404, se aumenta el caudal del medio de perfusión 1432 hasta aproximadamente 2 microlitros por minuto eliminando las células del canal 1428 que no se adhirieron a la pared del canal 1404. Después de la eliminación, la pared del canal 1404 se reviste con una capa de células. La mayoría de las células es confluyente y está en contacto con otras células y con la matriz. Por motivos de ilustración, la vista esquemática a través del lado del canal representa células que revisten el lado lejano mostrado como sombreado gris 1434, mientras que aquellas células en la parte superior y en la parte inferior del canal se representan esquemáticamente subrayadas en negro 1436, 1438. En algunas regiones, las células pueden ser dos o más capas gruesas 1436, pero la mayoría de las células están presentes como capas individuales 1438. En algunos casos, las células pueden no estar en contacto con otras células 1440, siendo inicialmente sub-confluyentes hasta que la posterior proliferación forme el vaso precursor.

Con referencia ahora a la FIG. 15A, se representa un ejemplo de una matriz de colágeno 1500 con un canal representativo 1510 de aproximadamente 150 micrómetros de diámetro con una pared superior 1530 y una inferior 1534. Este canal 1510 se sembró a una alta densidad con HUVEC como se describe en la FIG. 14A-C. La matriz de colágeno se formó con aproximadamente  $3 \text{ mg/ml}$  de concentración final. Concentraciones superiores o inferiores de colágeno o de equivalente pueden realizarse en realizaciones alternativas. En algunos ejemplos, pueden usarse composiciones de matriz alternativas o híbridas.

Con referencia ahora a la FIG. 15B, la misma matriz 1500 y el mismo canal 1510 se muestran sembrados con células endoteliales de vena umbilical humana adherentes 1520, 1540, 1544 (HUVEC). En este ejemplo, las células se sembraron de modo que las células parecieran estar compactadas de forma máxima en el canal a aproximadamente 1000 a 2000 células por  $\text{mm}^2$  cuadrado del canal.

Durante la siembra, el flujo de perfusión se detuvo de forma natural formando un tapón durante aproximadamente un segundo que se resolvió sin cambiar el caudal continuando la perfusión. La bomba se inactivó en este punto deteniendo la perfusión durante aproximadamente 30-45 minutos, permitiendo que las células se adhirieran a la pared del canal de células y después sometiendo a perfusión en curso. Posteriormente, la bomba se activó a la tasa de 2 microlitros/minuto que se usó para eliminar las células no adherentes produciendo un canal revestido con células, de una 1520 o dos o más 1540 capas de profundidad. En algunos casos, podría usarse un ajuste de flujo de perfusión mayor si fuera necesario para facilitar el flujo y la eliminación de las células. Las células en la parte superior 1540 o en la parte inferior 1520 están en el centro y parecen más refractarias. Las células visibles en la

parte central 1540 están algo fuera de foco, lo que representa células adherentes en los lados cercano y lejano del canal.

5 En la FIG. 15C, se representa esquemáticamente el canal 1510 de la FIG. 15B (vista desde el extremo en el canal). Esto representa el canal después de que las células no unidas se hayan eliminado por lavado. La mayoría de las células 1520, 1540, 1544 están en contacto directo entre sí y con la pared del canal 1530/1534, formando una funda confluyente de células que, en la mayoría de los casos, son de una capa de grosor. Algunas regiones pueden incluir dos o más capas de células 1540. En algunos casos, puede haber regiones presentes donde las células están casi en contacto con otras células y son sub-confluyentes 1550. La proliferación posterior de las células normalmente cubrirá estas regiones según crece el vaso precursor.

15 Con referencia ahora a la FIG. 16, se muestra un ejemplo de la activación de la competencia de brote para las células (HUVEC). El panel superior muestra un canal 1610 dentro de una matriz de colágeno que se ha sembrado con una pluralidad de células 1620 en un gradiente de densidad celular 1630. El gradiente celular se creó deteniendo el flujo entrante de células de forma prematura, por tanto, hubo menos cobertura celular por volumen de canal en el extremo anterior del canal 1604 y células más concentradas en el extremo posterior 1608. Se permitió que las células se adhirieran durante aproximadamente 45 minutos y después se sometieron a perfusión. Los vasos precursores dentro de lúmenes intactos normalmente se forman rápidamente, en minutos, y parecen formarse casi instantáneamente cuando se siembran células a concentraciones de alta densidad. Entonces se forma una monocapa completa cuando las células se adhieren y despliegan, lo que sucede habitualmente en aproximadamente 20 30-60 minutos. Cuando se usa una concentración celular inferior, se tarda más en formar una monocapa completa.

25 El brote de microvasos desde vasos precursores también depende de la densidad de siembra. En vasos precursores sembrados de alta densidad, los primeros brotes minúsculos observados como simplemente protuberancias celulares, son visibles después de unas pocas horas. Los brotes más grandes habitualmente se desarrollan durante los primeros 2-3 días después de la siembra.

30 El centro 1600 del gradiente de densidad celular es donde el fenotipo de brote drástico se activa por primera vez y es observable. Puede observarse en el panel superior en el día 1 de crecimiento que la mayoría, pero no todas, las células 1634 están en contacto con células adyacentes en el espacio 3D dentro del canal. Las células 1620 también están en contacto con la pared del canal.

35 El panel inferior muestra un vaso precursor 1640 después de 12 días de crecimiento con perfusión en el mismo canal 1610. El inicio del brote drástico de los microvasos se observa desde la región central 1644 del vaso precursor. Esta región corresponde a la densidad celular indicada por la barra 1600 en el panel superior. Se observa en un punto más anterior (1612) un brote incluso más drástico, mientras que el extremo posterior del vaso precursor correspondiente a la densidad inferior de células no muestra brote 1660. El brote de microvasos continúa y aumenta la proliferación según aumenta la densidad de siembra celular 1650. La demarcación entre el dominio quiescente y el dominio de brote 1664 es claro y se correlaciona llamativamente con la densidad de siembra. En la mayoría de los casos, una siembra de baja densidad producía vasos precursores quiescentes que no proliferaban y brotaban 40 microvasos. Esta observación sugiere que una densidad umbral de siembra desencadena el fenotipo.

45 La estimación de la densidad celular que desencadena la activación de las células se abordó adicionalmente en experimentos cuantitativos (por ejemplo, véanse la FIG. 20A-F y la FIG. 21A-B).

50 Es posible que células sembradas por debajo de esta densidad puedan retener alguna capacidad reducida de brotar como microvasos. Además del desencadenante de contacto entre células, la composición del producto de perfusión también se cree que confiere competencia para el brote. Los factores de crecimiento presentes en el medio de perfusión pueden actuar de forma sinérgica con la señalización de contacto celular para mediar el fenotipo. Adicionalmente, los contactos de la matriz celular también pueden contribuir al fenotipo. Además, las fuerzas físicas del flujo de perfusión, la presión y la tensión de la formación de tampón también pueden contribuir a la activación de la competencia de brote en las células. Sin embargo, el desencadenante del contacto celular parece contribuir significativamente a la activación del fenotipo de competencia de brote.

55 Con referencia ahora a la FIG. 17, se muestran ejemplos de dos conjuntos de vasos precursores en tándem derivados de una siembra de alta densidad que están experimentando anastomosis para formar redes de microvasos 3D complejas. Se incubaron CPD individuales con perfusión en el tiempo y se procesaron en puntos temporales con el final más largo a las 5 semanas. En la mayoría de los experimentos, los canales estaban separados a una distancia de aproximadamente 500 micrómetros, pero también se examinaron otras configuraciones. La distancia máxima entre los canales que pueden atravesar los microvasos no se ha determinado. Sin embargo, los microvasos deben poder crecer hacia los otros vasos precursores desde más de 500 micrómetros hasta aproximadamente varios milímetros.

65 Se representan vasos precursores 1710, 1720 que crecen desde el conducto 1704, después de una semana 1700 y tres semanas 1740. Después de una semana de crecimiento 1700, el primer vaso 1710 y el segundo 1720 se observan expandiéndose en diámetro con sus microvasos asociados 1730 brotando para formar la red de

microvasos entre los dos vasos. En un ensayo similar 1740, después de 3 semanas surge la red de microvasos 1750 a través de anastomosis y permanece viable y con capacidad de perfusión. Los vasos precursores 1760, 1770 pueden observarse, pero han surgido casi completamente en la red de microvasos. En algunos ejemplos, la red de microvasos que ha surgido a tal grado que se forma una cavidad, sin embargo, la red aún es capaz de perfundirse a través de los microvasos.

El tiempo de incubación necesario hasta que las redes de microvasos surgen a través de anastomosis depende de la colocación original y distancia entre los canales. La perfusión de vasos precursores en tándem produjo la formación de brote y redes de microvasos 3D complejas. Los microvasos de brote crecieron en 3D desde los vasos precursores. Si los vasos precursores estaban originalmente cercanos, las redes de microvasos de brote habitualmente anastomosaban en una red de microvasos surgidos más grande que permanecía viable y competente para la perfusión.

Se han examinado periodos de hasta cinco semanas con perfusión continua en curso. Una mayoría de células en todos los vasos precursores y redes de microvasos complejas y ampliadas permanecían viables como se ensaya con tinción de viabilidad de fluorescencia vivo/muerto. Los colorantes útiles tales como vivo/muerto están disponibles en el mercado de, por ejemplo, Invitrogen Corp. de Carlsbad CA. Globalmente, el brote se ralentiza en el tiempo reflejando probablemente los límites en el cultivo *in vitro* de cultivos celulares primarios de HUVEC.

Los microvasos de brote probablemente crecen y también se retraen dependiendo de los nutrientes, las señales celulares y las condiciones de cultivo (por ejemplo, presencia o ausencia de suero y factores específicos de crecimiento). La estabilidad de los microvasos recién formados y la maduración en vasos más maduros puede ensayarse por métodos de esta descripción usando células endoteliales y tipos celulares adicionales. Los microvasos compuestos que comprenden células endoteliales han demostrado estabilizarse por las condiciones de cultivo y la presencia de células de soporte. Por ejemplo, factores de crecimiento tales como VEGF, IGF-1 con condiciones sin suero han demostrado promover la angiogénesis y estabilidad aumentada a corto plazo de redes de tipo capilar *in vitro* (French, Lindemann *et al.* 2001). Asimismo, se ha demostrado que la adición de células perivasculares tales como pericitos y células de músculo liso puede estabilizar dichos capilares recién formados y ayudar en su maduración (Frerich, Lindemann *et al.* 2001). Es posible que la adición de tipos celulares adicionales tales como células progenitoras endoteliales (vasculares) o células madre acopladas a una condición definida de cultivo en productos de perfusión también pudiera ayudar a la estabilidad y maduración de los microvasos compuestos.

Con referencia ahora al FIG. 18, los vasos precursores crecidos después de uno a ocho días de perfusión luminal se muestran en varios paneles adyacentes para ilustrar las características adicionales de crecimiento. Cada CPD usado para hacer crecer vasos precursores se manipulo de forma similar y se procesó para la formación de imágenes de cada vaso precursor 1800, 1810, 1820 y 1830, en el día indicado. Cada vaso precursor se perfunde desde el conducto 1804 visible en algunos de los paneles. El primer panel después del día 1 de perfusión muestra el vaso precursor 1800 con solamente brote naciente de microvasos 1808. En el siguiente panel después del día 5 de perfusión el vaso 1810 muestra brote robusto del microvaso 1840. El aumento visible en el diámetro del vaso precursor 1814 también es evidente. En el siguiente panel en el día 6 de perfusión el vaso precursor 1820 parece haber alcanzado un aumento de aproximadamente dos veces el diámetro original de 150 micrómetros. Parece que la proliferación de las células del vaso precursor abarca el conducto 1804 que crece sobre los extremos 1824. El panel final después de 8 días de perfusión muestra que el vaso precursor 1830 continúa el brote de microvasos 1840 y ha continuado aumentando ligeramente de diámetro. También el crecimiento del vaso sobre el extremo del conducto 1804 es evidente en 1834.

Se cree que la expansión en el diámetro de cada vaso precursor procede tanto de la invasión y el crecimiento de células dentro de la matriz de colágeno como de respuestas del vaso a la presión del flujo de perfusión. El grado de proliferación celular y brote se observó que era continuo en el tiempo, pero se ralentizaba un poco después de varias semanas de incubación. La ralentización del crecimiento y el brote puede deberse a la limitada vida útil de las HUVEC *in vitro*.

Con referencia a la FIG. 19, se muestran imágenes de reconstrucción 3D confocales de una red de microvasos representativa. Las redes de microvasos 1900 se cultivaron usando los métodos de siembra de alta densidad descrito previamente. Los microvasos de brote se marcaron con aglutinina de germen de trigo marcada con rodamina para visualizar la estructura de membrana de las células endoteliales en los microvasos y con el colorante de ADN fluorescente 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para mostrar los núcleos.

En el panel A, se observa que los microvasos 1910 se ramifican con lúmenes permeables no obstruidos intactos basándose en las estructuras de tubo 3D y perfusión. En el panel B, se representa un aumento mayor de los microvasos 1920 con una estructura, de vaso tubular intacta. Los núcleos 1930 de las células endoteliales individuales también se muestran para esta muestra. Las ramificaciones desde el microvaso son evidentes 1940, que están intactas con lúmenes permeables no obstruidos con núcleos. La estructura de los microvasos es coherente con la viabilidad evaluada por tinción y capacidad para la perfusión.

*Análisis cuantitativo del brote*

5 Con referencia ahora conjuntamente a la FIG. 20A- FIG. 20F y la FIG 21A- FIG. 21B, se hizo una serie de ensayos con análisis de imágenes cuantitativas para determinar la densidad de siembra mínima y máxima que desencadena el fenotipo de competencia e brote, así como aspectos de crecimiento de brotes. Se sembraron células endoteliales como se describe previamente en un CPD1350 y se incubaron para formar vasos precursores de brote. Las muestras se examinaron en puntos temporales después de la siembra, medidos en horas (h) para examinar los efectos de incubación tanto a corto plazo como a largo plazo sobre el brote. El crecimiento de microvasos precursores de brote se analizó por experimentos de incubación desde hasta 96 h con datos analizados a 0,24 h, 48 h, 72 h y 96 horas (h), después de la siembra. Las densidades mínima y máxima de siembra de células que proporcionaban brotes se determinaron junto con mediciones de la longitud de brote promedio a lo largo de la posición del microvaso precursor.

15 Las mediciones de la densidad de siembra de células se realizaron analizando los datos de videoimágenes para el valor medio en escala de grises (GSV) a lo largo de la longitud del vaso. Las imágenes analizadas se adquirieron usando microscopía de campo oscuro de transmisión con un objetivo 4 x 0,10 NA. Se seleccionó una región de interés (ROI) de 100 píxeles de amplitud cada 100 píxeles a lo largo de la longitud del vaso para muestrear el GSV medio dentro de cada recuadro. Para compensar la iluminación de fondo no uniforme, se usó otro conjunto similar de ROI para muestrear el fondo que rodea el vaso. El GSV medio corregido con el fondo se representó frente a la posición a lo largo del vaso. Para calcular la densidad de siembra de células, se estableció la relación entre la cantidad de células y el valor medio en escala de grises dentro de una ROI dada. Se descubrió que la relación entre la siembra de células y el GSV era aproximadamente lineal dentro del intervalo de recuentos celulares medidos (datos no mostrados). La pendiente de la línea de mejor ajuste se usó en cálculos para relacionar el GSV con la densidad de siembra de células.

25 Con referencia ahora a la FIG. 20A, se representa el diagrama de la densidad de siembra de células inicial frente a la posición a lo largo del vaso precursor 2000. Se estableció la densidad mínima de siembra de células representando la longitud de brote frente a la densidad de siembra de células, donde la longitud del brote es igual a cero para las líneas de mejor ajuste de este diagrama, esta es la densidad mínima de siembra de células. Estos valores son de 362 células por milímetro cuadrado para 24 h, 340 células por milímetro cuadrado, para 48 h, 317 células por milímetro cuadrado, 293 células por milímetro cuadrado, 96 h. Los experimentos de siembra real mínima para la densidad de siembra de células, siempre será mayor que los valores citados anteriormente (por ejemplo, 296 células/milímetro cuadrado para 96 h) y se representan en la FIG. 21B.

35 Con referencia ahora conjuntamente la FIG. 20B a FIG. 20F, las imágenes de microscopía de microvasos precursores de brote de los experimentos de crecimiento a corto plazo se resumen en la FIG. 20A (anterior). La FIG. 20B, se muestra la siembra inicial de células 2008 con una superposición de la densidad de siembra de células 2012. En la FIG. 20C, se muestra los microvasos precursores de brote después de 24 h de incubación después de la siembra 2016. Los brotes representativos se muestran en la parte central del microvaso precursor de 2018. Un brote viable para la región de densidad más baja se indica por la línea blanca 2020. Los mismos vasos precursores se muestran después de 24 h 2024, 72 h 2032 y 96 h 2040. La densidad inicial mínima de siembra donde se encontró un brote viable también se muestra por líneas blancas para cada 2028 (48 h), 2036 (72 h), 2044 (96 h). La longitud de brote global aumenta con el tiempo como se observa por los brotes representativos desde el centro de cada microvaso precursor 2026 (48 h), 2034 (72 h), 2042 (96 h). En la FIG. 20F, es visible una burbuja de aire justo a la izquierda de la línea blanca 2044 para la densidad mínima para un brote viable. Puede observarse que el brote es casi uniforme sobre el dominio donde es evidente en brote.

50 Los datos de experimentos para experimentos de crecimiento a corto plazo establecieron la densidad mínima de siembra requerida para el brote. El valor mínimo para el brote fue de aproximadamente 250 células adheridas por milímetro cuadrado. Este mínimo puede compararse con el valor máximo medido de aproximadamente 1000 a 2000 células por milímetro cuadrado, donde las células visualmente parecen estar compactadas de forma máxima dentro del conducto o canal durante la siembra. Las 1000 a 2000 células por milímetro cuadrado medidas está de acuerdo con los valores máximos teóricos.

55 Con referencia ahora a la FIG. 21A y la FIG. 21B, la longitud promedio de brote también se determinó para el crecimiento de vasos precursores de 0 a 96 h. En la FIG. 21A, se muestra la longitud de brote 2100 para 24 h, 2116, 48 h, 2108, 72 h, 2112, y 96 h, 2116. La longitud de brote está de acuerdo razonablemente con las mediciones directas de las imágenes de microscopía.

60 Con referencia ahora a la FIG. 21B, se muestra un gráfico de la longitud promedio de brote frente a la densidad inicial de siembra 2120. La línea de mejor ajuste para cada punto temporal analizado también se muestra 24 h, 2124, 48 h, 2128, 72 h, 2132, y 96 h, 2136. Los datos de densidad celular mínima pueden encontrarse desde donde la línea de mejor ajuste cruza el eje x, la densidad inicial de siembra (número de células por milímetro cuadrado). Una vista ampliada mostraría que las intersecciones son los valores de 362 células por milímetro cuadrado para 24 h, 340 células por milímetro cuadrado, para 48 h, 317 células por milímetro cuadrado, 293 células por milímetro cuadrado, 96 h.

Debe observarse que puede haber un factor engañoso respecto a la medición de la longitud de brote. Como el diámetro interior de un microvaso se hace más grande, este no se ha tenido en cuenta en el análisis actual. Por tanto, se incluye cualquier cambio en el diámetro en los valores de longitud de brote.

5 Con referencia ahora a la FIG. 22, se examinaron vasos precursores compuestos que consisten en HUVEC y células de músculo liso aórtico de rata (RASMC). Las HUVEC se marcaron con colorante fluorescente (indicador celular verde) y se sembraron a altas densidades y con métodos descritos anteriormente en esta descripción donde era evidente el fenotipo de brote aumentado. Después del crecimiento durante aproximadamente 24 h, las HUVEC formaban vasos precursores de brote que se sometieron a perfusión en curso con un medio de crecimiento. Las RASMC se sembraron en los vasos precursores de HUVEC y se observó que se adherían a la pared del microvaso y posteriormente migraban a través de la pared del microvaso asumiendo una posición perivascular. En la FIG. 22 se muestra una superposición de las imágenes de campo fluorescente y brillante 2200 de microvasos precursores de brote de HUVEC y RASMC compuestos. Los microvasos precursores se observan con tinción oscura 2210, mientras que las RASMC perivasculares aparecen claras 2220. La migración de la RASMC a la posición perivascular alrededor de los microvasos precursores de HUVEC es coherente con su función conocida de soporte en la maduración de los vasos y la estabilidad.

### Ensayos y dianas para investigación de angiogénesis

20 La capacidad de activar drásticamente las HUVEC para un fenotipo competente de brote proporciona una capacidad aumentada de seleccionar productos que sean angiogénicos o que sean angiostáticos dentro del producto de perfusión, la matriz o que se obtengan de células y tejidos normales, patogénicos (por ejemplo, cancerosos, infectados por virus) o modificados por ingeniería. El control de las redes de microvasos proporciona una medida eficaz donde el brote aumentado y el crecimiento de microvasos, indica un efecto angiogénico y brote reducido y el crecimiento de microvasos indica un efecto angiostático. También puede ensayarse la contribución de células endoteliales, células de músculo liso, pericitos y fibroblastos junto con células progenitoras y células madre para aspectos adicionales de la formación y función de los vasos. Además, pueden ensayarse células cancerosas para su potencial angiogénico habiéndolas suspendido en la matriz. El desarrollo y crecimiento de tejidos complejos puede examinarse mejor con la vascularización mejorada ahora disponible. El robusto aumento en el brote de microvasos proporciona un sistema de ensayo sensible.

La hipótesis de que la señalización mediada entre células es principalmente responsable de la activación del fenotipo de brote puede ensayarse examinando genes candidatos y sus productos génicos que se sabe que facilita la señalización celular en la adhesión de células endoteliales homófilas. La contribución de la señalización mediada entre células y matriz, la señalización mediada por factores de crecimiento y células y la señalización mediada por detección mecánica relacionada con el flujo de producto de perfusión también puede abordarse para determinar el fenotipo celular global y el comportamiento en la formación de vasos. Además, la promesa de la capacidad de regular la activación del fenotipo de brote proporciona incluso beneficios adicionales para modelos de angiogénesis e investigación.

#### 40 *Marcadores específicos endoteliales*

Los genes diana en células endoteliales pueden modificarse genéticamente a través de métodos de ADN recombinante para examinar su contribución a los fenotipos celulares incluyendo, aunque sin limitación, la activación del fenotipo de competencia de brote. Los genes marcadores específicos expresados en células endoteliales son dianas atractivas para la manipulación y ensayo en ensayos usando métodos de esta descripción. Las líneas celulares derivadas de endotelio también pueden examinarse tales como las derivadas de macrovasos y de microvasos. Las células endoteliales presentan heterogeneidad significativa *in vivo* (Aird 2007). Se han identificado numerosos genes expresados de forma preferente en endotelio arterial o endotelio venoso. Las células endoteliales arteriales han demostrado expresar específicamente varios genes incluyendo efrina B2 (Gale, Baluk *et al.* 2001), delta tipo 4 (DII4) (Krebs, Xue *et al.* 2000), quinasa de tipo receptor de activina (Alk1) (Seki, Yun *et al.* 2003), proteína de dominio PAS endotelial (EPAS1) (Tian, McKnight *et al.* 1997), Hey1 (Nakagawa, Nakagawa *et al.* 1999), Hey2 (Nakagawa, Nakagawa *et al.* 1999), neuropilina 1 (NRP1) (Mukouyama, Gerber *et al.* 2005), y proteína decidual inducida por progesterona (Depp) (Shin y Anderson 2005). Las células endoteliales venosas han demostrado expresar específicamente varios genes incluyendo EphB4 (Gerety, Wang *et al.* 1999), neurofilina 2 (NRP2) (Yuan, Moyon *et al.* 2002), COUP-TFII (You, Lin *et al.* 2005), y  $\beta$ -tubulina de clase III en la punta de las válvulas venosas (Kang y Lee 2006).

Cada uno de estos genes conocidos podría obtenerse y modificarse por ingeniería genética para ensayar el efecto de la sobreexpresión, dosificación génica, mutaciones o pérdida de función, sobre la función de las células endoteliales en la angiogénesis usando métodos presentados en esta descripción. Los datos de secuencia están disponibles para cada uno de estos genes de la base de datos de secuencia genética NIH Genbank que facilita dicho análisis. Base de datos de secuencia genética Genbank del NIH. Genbank es una colección acotada de todas las secuencias de ADN disponibles al público (Benson, Karsch-Mizrachi *et al.* 2008).

65

*Líneas celulares endoteliales*

Ensayar subpoblaciones de células endoteliales de fuentes particulares o líneas celulares establecidas derivadas de endotelio proporciona avances en la comprensión de la angiogénesis y en la regulación del crecimiento de los vasos. Por ejemplo, las líneas celulares endoteliales derivadas de fuentes de macro o microvasos arteriales podrían seleccionarse para formar microvasos usando CPD y métodos de esta descripción. Las líneas celulares candidatas con vida útil prolongada o que están inmortalizadas podrían caracterizarse adicionalmente para cariotipos normales y fenotipos no tumorigénicos, así como patrones de expresión de proteínas adhesivas y moléculas de coagulación (Bouis, Hospers *et al.* 2001). Las líneas celulares endoteliales preparadas a partir de vena umbilical humana (HUVEC) que tienen vida útil prolongada, están caracterizadas en grados variables, pero que no están inmortalizadas, existen incluyendo ESV233, ESVSF108, ESV2010 (INS/EGF), ESV2010-GF (Hohenwarter, Jakoubek *et al.* 1994). Existen varias líneas celulares endoteliales inmortalizadas que están bien caracterizadas, incluyendo la línea derivada de macrovasos EA.hy926 (Edgell, McDonald *et al.* 1983), la línea derivada de macrovasos EV304 (Takahashi, Sawasaki *et al.* 1990), y la línea derivada de microvasos HMEC-1 (Ades, Candal *et al.* 1992). Adicionalmente, existen líneas celulares y también podrían generarse nuevas líneas para su estudio.

Las líneas celulares endoteliales con vida útil prolongada o que están inmortalizadas podrían ensayarse para su función en la formación de vasos y en la angiogénesis usando métodos presentados en esta descripción. El uso de líneas endoteliales candidatas ofrece la ventaja práctica de su vida útil prolongada *in vitro*, su cariotipo estable informado y los fenotipos asociados. Adicionalmente, dichas líneas celulares podrían modificarse genéticamente o por ingeniería adicionalmente para explotar sus fenotipos celulares existentes. Además, también pueden aislarse células endoteliales de pacientes para ensayar el modo en que responden a ciertos fármacos usando enfoques de medicina personalizada con métodos de esta descripción. Lo mismo es cierto para células cancerosas. Adicionalmente, podrían utilizarse células y líneas celulares similares derivadas de tejido linfático en métodos de esta descripción.

*Adhesión celular y rutas de señalización*

El fenotipo de brote activado induce la proliferación de microvasos que brotan de los vasos precursores. Este fenotipo está probablemente relacionado con respuestas celulares a señales proliferativas. Durante la angiogénesis, los brotes capilares crecen desde vasos más grandes que contienen células inhibidas por contacto. Los genes y sus productos proteicos de adhesión y rutas de señalización asociadas con inhibición por contacto son candidatos a ensayar a través de métodos de esta descripción para obtener apreciaciones sobre la formación de vasos y la angiogénesis.

La activación de la competencia de brote observada con HUVEC depende de la densidad de siembra probablemente de contactos entre células. Las contribuciones del contacto entre células y matriz, así como contactos entre células y factores de crecimiento e incluso la señalización mecánica de la siembra y el flujo de perfusión también están implicadas potencialmente la activación de la competencia de brote. Todas estas fuentes de estímulos implican señalización y pueden integrarse para mediar el fenotipo celular global y el comportamiento.

Las uniones adherentes desempeñan funciones importantes entre las células endoteliales para la inhibición por contacto del crecimiento celular y la permeabilidad para celular a solutos y leucocitos en circulación. Las uniones estrechas también están implicadas en la adhesión celular y son responsables de la regulación de las funciones de barrera y la polaridad (Wheelock y Johnson 2003; Bazzoni y Dejana 2004). Adicionalmente, otras proteínas de adhesión, tales como la molécula de adhesión de células endoteliales de plaquetas, PECAM-1, encontradas en uniones intercelulares endoteliales, están implicadas en la adhesión celular y la señalización celular.

Las células endoteliales forman uniones adherentes únicas entre células que contienen una cadherina específica endotelial, VE-cadherina. Las células endoteliales también expresan N-cadherina, T-cadherina y una proteína relacionada llamada VE-cadherina-2. La VE-cadherina y las otras cadherinas expresadas en células endoteliales transfieren información de forma intracelular a través de interacciones con una red compleja de proteínas del citoesqueleto y moléculas de señalización. La VE-cadherina forma complejos con la  $\beta$ -catenina, la placoglobina y la catenina p120 y probablemente contacto con el citoesqueleto de actina en estructuras que son similares a uniones adherentes típicas. La formación de uniones adherentes endoteliales, el mantenimiento y el desensamblaje son puntos importantes de la regulación para la formación de los vasos y su función.

Las rutas de señalización asociadas con las uniones adherentes endoteliales incluyen la ruta de wnt, GTPasas Rho y señalización a través de tirosina quinasas receptoras y son candidatos para estudio adicional de la activación del fenotipo de competencia de brote. Se deduce que los genes y productos proteicos de estas rutas de señalización, además de los componentes de las uniones adherentes VE-cadherina, N-cadherina, T-cadherina y VE-cadherina-2, así como las proteínas de interacción de VE-cadherina p-catenina, placoglobina y catenina p120, así como PECAM-1, son candidatos para la manipulación y para ensayo en el ensayo de redes de microvasos de esta descripción. Además, los eventos posteriores que son desconocidos podrían dilucidarse usando los ensayos de microvasos y los métodos de esta descripción.

Los componentes de las uniones estrechas también son conocidos e incluyen proteínas adhesivas transmembrana, moléculas intracelulares y rutas de señalización. La ocludina, las claudinas (por ejemplo, claudina 1 y 2 y otros miembros de la familia de claudinas), moléculas de adhesión de unión (por ejemplo, JAM-A, JAMB, JAMC) están implicadas en las funciones adhesivas de unión estrecha. Los componentes intracelulares de las uniones estrechas incluyen miembros de la familia de guanilato quininas asociadas a membrana (MAGUK) incluyendo ZO-1 y, ZO-2 y ZO-3 relacionadas, junto con proteínas no MAGUK de AF-6/afadina, Par-3/ASIP y MUPP-1 (Bazzoni y Dejana 2004). La manipulación de los componentes de unión estrecha puede proporcionar información importante acerca de la activación de la competencia de brote y ayudar a determinar la función de barrera de dichos vasos. Además, los eventos posteriores que son desconocidos podrían dilucidarse usando los ensayos de microvasos y los métodos de esta descripción.

Cada uno de los genes conocidos de las uniones adherentes y las uniones estrechas o componentes de señalización asociados podría aislarse sin esfuerzo excesivo y modificarse por ingeniería genética para ensayar el efecto de la sobreexpresión, la dosificación génica, las mutaciones o la pérdida de función sobre la función de las células endoteliales en la angiogénesis usando métodos presentados en esta descripción. Están disponibles datos de secuencia para cada uno de estos genes de la base de datos de secuencias genéticas Genbank del NIH que facilitan dicho análisis.

#### *Morfogénesis de células endoteliales en la angiogénesis y la vasculogénesis*

La morfogénesis de las células endoteliales incluye la angiogénesis, donde se forman vasos a partir de vasos existentes, así como la vasculogénesis, donde se forman vasos a partir de células endoteliales (EC) o precursores de EC y células progenitoras en tejidos o a partir del suministro a través de la circulación. La morfogénesis de células endoteliales también incluye casos donde los microvasos retroceden basándose en la entrada de señalización y la regulación.

El fenotipo de brote activado induce la proliferación de brote de microvasos desde los vasos precursores. Este fenotipo también está relacionado probablemente con la morfogénesis de células endoteliales a partir de contactos entre células endoteliales y también a partir de contactos entre células endoteliales y la matriz extracelular (ECM). Se ha demostrado que la morfogénesis de las células endoteliales en la formación de nuevos vasos se ve afectada por la ruta de señalización de matriz-integrina-citoesqueleto (MIC) (Revisión, Davis, Bayless et al. 2002).

Esta ruta de MIC empieza con interacciones entre las células a través de contactos de unión entre las células y a partir de interacciones entre las células y los componentes de la matriz extracelular. La implicación de las integrinas (por ejemplo,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$ ) y las interacciones de la matriz extracelular, la participación de los elementos del citoesqueleto (por ejemplo, actina, microtúbulos y citoesqueletos de filamentos intermedios) y la señalización posterior y las moléculas reguladoras (por ejemplo, GTPasas Rho, Rho A, Rac1, Cdc42, PAK-1, factores inhibidores laterales, proteinasas degradantes de la ECM) contribuyen todas a la capacidad de las células endoteliales de formar estructuras tubulares, brotes y ramificaciones como nuevos microvasos durante la morfogénesis.

Se postula que las metaloproteinasa de matriz de tipo de membrana (MT-MMP) que degradan la ECM participan en la morfogénesis de las células endoteliales (Hiraoka, Allen et al. 1998); (Hotary, Allen et al. 2000). Los candidatos para el estudio y la manipulación son MMP-1, MMP-2, MMP-9, así como otras MT-MMP equivalentes (Davis, Bayless et al. 2002). Además, los inhibidores que bloquean las MT-MMP, tales como la proteína TIMP-2, y el inhibidor químico de MMP GM6001 han demostrado bloquear la morfogénesis de las células endoteliales cuando se suspenden células endoteliales en colágeno (datos no publicados, Davis, Bayless et al. 2002). TIMP-2 inhibe la proliferación de células endoteliales y es un miembro de la familia de TIMP de inhibidores naturales de metaloproteinasa. El químico GM6001 es un inhibidor de colagenasas y está disponible en Millipore.

La inhibición lateral es un fenómeno donde subconjuntos de células producen factores que inhiben las células adyacentes, lo que puede provocar diferenciación selectiva. Dichos factores inhibidores podrían desempeñar una función en la densidad de los brotes endoteliales (Davis, Bayless et al. 2002). Por ejemplo, moléculas que han demostrado regular la inhibición lateral son los ligandos de Notch Jagged y Delta (Lindsell, Boulter et al. 1996; Zimrin, Pepper et al. 1996; Bell, Mavila et al. 2001). Además, el receptor Notch 1 y Notch 4 han demostrado estar presentes en células endoteliales (Zimrin, Pepper et al. 1996; Uyttendaele, Closson et al. 2000; Lindner, Booth et al. 2001). Estos factores son candidatos para estudio y manipulación para determinar su función global en la morfogénesis endotelial.

La manipulación de los componentes de MIC y el ensayo de productos individuales de las rutas de MIC y posteriores es factible en los métodos de esta descripción. Muchos genes y productos génicos asociados con la señalización de MIC y la morfogénesis de las células endoteliales son conocidos y podrían ensayarse en el ensayo de microvasos para su contribución a la competencia de brote y la angiogénesis.

Los genes de la ruta de MIC conocida o los componentes asociados de señalización y reguladores podrían aislarse sin esfuerzo excesivo y modificarse por ingeniería genética para ensayar el efecto de la sobreexpresión, la



dosificación génica, las mutaciones o la pérdida de función en la morfogénesis de las células endoteliales usando métodos presentados en esta descripción. Están disponibles datos de secuencia para muchos de estos genes de la base de datos de secuencias Genbank del NIH que facilitan dicho análisis.

##### 5 Selección de productos de afectan a la angiogénesis

Con referencia ahora a la FIG. 23, se muestra esquemáticamente un ensayo para seleccionar células (C), productos (P) y tejido (T) que afectan a los vasos precursores, el brote de microvasos y la formación de redes de microvasos. Utilizando un CPD tal como el CPD 1350, el CPD 900 o equivalente, y métodos de siembra de alta densidad para activar el fenotipo competente de brote, pueden examinarse las respuestas de brote de microvasos, así como la formación de redes de microvasos. Las redes de microvasos pueden usarse para seleccionar factores angiogénicos y angiostáticos en la matriz o el medio de perfusión controlando la formación de la red de microvasos, donde el crecimiento aumentado de la red indica un factor angiogénico y el crecimiento disminuido de la red indica un factor angiostático.

Los candidatos, incluyendo células, (C) productos (P) y tejido (T) pueden ensayarse dispersados por toda la matriz o concentrados localmente. Como alternativa, las células (C) y productos (P) pueden añadirse al medio de perfusión. En muchas realizaciones, pueden ensayarse los productos bioactivos que pueden liberarse desde los diferentes candidatos que se están ensayando. Bioactivo significa que los candidatos afectan al crecimiento de los microvasos de brote de alguna manera discernible, por ejemplo, proporcionando diferencias medibles en el crecimiento.

En los métodos de las reivindicaciones adjuntas, las células son células endoteliales. También descrito en este documento, pero no reivindicado, las células pueden ser células de músculo liso, pericitos, células fibroblásticas, células progenitoras, células madre, células musculares, células hepáticas, células pulmonares, células cutáneas, células epiteliales, células humanas, células animales, células vegetales, células eucariotas, células modificadas por ingeniería genética, células modificadas genéticamente, células enfermas, células infectadas por virus y células cancerosas. Los productos pueden incluir factores de crecimiento (por ejemplo, factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), ésteres de forbol (por ejemplo, 12-miristato-13-acetato de forbol (PMA)), factor de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), factores de crecimiento de unión a heparina (HB-EGF), interleuquina-8 (IL-8), factor de crecimiento de tipo insulina R3 largo (R3IGF-1), factores de crecimiento de tipo insulina (por ejemplo, IGF-1), factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF), factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), factor de crecimiento de tipo EGF de unión a heparina (HB-EGF), citoquinas, angiopoyetinas, factor de crecimiento placentario, diversas quimioquinas (por ejemplo, SDF-1 $\alpha$ ), TGF- $\beta$ , mitógenos solubles, proteínas de adhesión celular (por ejemplo, fibronectina, vitronectina, fibrina, proteínas de motivo de arginina-glicina-aspartato (RGD), péptidos de RGD, gelatina, colágeno y diferentes subtipos de colágeno), péptidos sintéticos y compuestos bioactivos equivalentes. Los tejidos pueden ser sanos, cancerosos, infectados con virus o modificados genéticamente o por ingeniería.

Al menos un tipo celular 2304 puede sembrarse a una alta densidad 2313 a través del conducto 2308 en un canal 2316 dentro de una matriz 2312 de un CPD 2300. El al menos un tipo celular puede ser HUVEC o combinaciones de tipos celulares (por ejemplo, SMC, pericitos, células progenitoras, células madre) algunos de los cuales son capaces de activarse para la competencia de brote como microvasos desde vasos precursores 2328, a través de contactos entre células, entre células y la matriz, entre células y factores de crecimiento y contactos físicos del flujo de perfusión. Como alternativa, las células 2336 pueden modificarse genéticamente o por ingeniería para liberar productos bioactivos. La incubación de los canales sembrados permite adicionalmente que el vaso precursor desarrolle una capa celular confluyente 2331.

Un primer medio de perfusión 2320 puede retirar las células 2304 que no se adhieren a la pared de la matriz del canal 2316 después de aproximadamente 45 minutos de incubación. El tiempo de incubación puede ser mucho más corto u omitirse, dependiendo de las condiciones experimentales. El primer medio de perfusión 2320 o un segundo medio de perfusión 2332 también proporcionan crecimiento del vaso precursor 2328.

En diferentes realizaciones, los medios de perfusión pueden ser de la misma composición o pueden formularse de forma diferentes según se requiera. Las células (C), productos (P) o tejido (T) 2311 pueden sembrarse en la matriz 2312 en diversas localizaciones concentrados de forma local o dispersados. Como alternativa, las células (C) o productos (P) 2314 se añaden al medio de perfusión 2320, 2332. Los productos (P), por ejemplo, compuestos bioactivos angiogénicos y angiostáticos, también pueden secretarse desde las células del vaso precursor 2828.

Con referencia ahora a la FIG. 24A y la FIG. 24B conjuntamente, la respuesta del brote de microvasos y la formación de redes a las células candidatas (C), los productos candidatos (P) y el tejido candidato (T) añadidos se representa esquemática después de la siembra de células a una alta densidad. Un parte de un vaso precursor individual se representa por motivos de ilustración solamente. Podrían analizarse series individuales, dobles o complejas de microvasos precursores en diferentes realizaciones en una serie de CPD.

En la FIG. 24A y la FIG. 24B, se muestran esquemáticamente dos CPD con diferentes cantidades de candidatos, incluyendo células candidatas (C), productos (P) o candidatos de tejido (T), concentrados localmente. En la FIG.

24A, se muestra el CPD 2400 que incluye una matriz 2404 con una cantidad mayor de células candidatas (C), productos (P) o tejido (T), 2408. Asimismo, puede añadirse una cantidad mayor de células (C) o productos (P) 2412 al producto de perfusión 2416. Después de incubación con perfusión, puede ensayarse el efecto de la adición de candidato (C), productos (P) o tejido (T) midiendo 2428 la longitud de los nuevos brotes 2420, 2424. Un efecto angiogénico de candidatos concentrados localmente provocará brote aumentado y más robusto 2420 cerca de los candidatos que se están ensayando, mientras que brotes distales a los candidatos mostrarán menos crecimiento 2424. Se esperaría que la adición de cantidades mayores de células (C) o productos (P) 2412 al producto de perfusión aumentara el crecimiento de los brotes en todos los lados del vaso precursor (no representado). En la FIG. 24B, el CPD 2430 incluye una cantidad inferior de células candidatas (C), productos (P) o tejido (T) 2124, concentrados localmente, o asimismo con cantidades inferiores de células (C) o productos (P) 2438 añadidas en el producto de perfusión 2416. Se esperaría que los brotes mostrarán menos crecimiento 2450 para los brotes 2442 cerca de los candidatos que se están ensayando en comparación con los CPD con mayores cantidades 2400. En algunos casos, los brotes cercanos 2442 y distales 2446 a los candidatos pueden ser de tamaño similar. Ensayando una amplia gama de cantidades para los candidatos, puede determinarse el efecto angiogénico basándose en el grado de crecimiento aumentado de nuevos brotes en comparación con los controles.

Con referencia ahora a la FIG. 25A y la FIG. 25B conjuntamente, se muestran esquemáticamente dos CPD con diferentes cantidades de células candidatas (C), productos (P) o candidatos de tejido (T), concentrados localmente. En la FIG. 25A, se muestra el CPD 2500 que incluye una matriz 2504 con una mayor cantidad de células candidatas (C), productos (P) o tejido (T) 2508. Asimismo, puede añadirse una cantidad mayor de células (C) o productos (P) 2512 al producto de perfusión 2516. Después de incubación con perfusión, puede ensayarse el efecto de la adición de candidato (C), productos (P) o tejido (T) midiendo 2528 la longitud de los nuevos brotes, 2520, 2524. Un efecto angiostático de los candidatos concentrados localmente provocará una disminución 2522 o incluso una ausencia de brotes 2520 cerca de los candidatos que se están ensayando, mientras que los brotes distales a los candidatos mostrarán algo de crecimiento o incluso crecimiento normal 2524. Se esperaría que la adición de cantidades mayores de (C) o productos (P) 2512 al producto de perfusión disminuyera el crecimiento de los brotes en todos los lados del vaso precursor (no representado). En la FIG. 25B, el CPD 2530 incluye una cantidad inferior de células candidatas (C), productos (P) o tejido (T) concentrados localmente 2534, o asimismo con cantidades inferiores de células (C) o productos (P) 2538 añadidas en el producto de perfusión 2516. Se esperaría que los brotes mostrarán más crecimiento normal 2550 para los brotes 2542 cerca de los candidatos que se están ensayando en comparación con los CPD con cantidades mayores 2500. En algunos casos, los brotes cercanos 2542 y distales 2546 a los candidatos pueden ser de tamaño similar, lo que indica menos efecto angiostático o ausente para los candidatos. Ensayando una amplia gama de cantidades para los candidatos, pueden determinarse los efectos angiostáticos basándose en el grado de inhibición de crecimiento de los nuevos brotes en comparación con los controles.

En realizaciones alternativas, podrían ensayarse cantidades crecientes de candidatos concentrados localmente en un único CPD. Además, podrían ensayarse diversas combinaciones en diferentes realizaciones en el ensayo de formación de microvasos. Por ejemplo, se representa solamente un vaso precursor en el esquema, pero diferentes realizaciones podrían tener dos o más vasos precursores con células (C), productos (P) y tejido (T) colocados en diversas localizaciones en la matriz, dispersados o concentrados localmente. En realizaciones alternativas, las células (C), productos (P) o tejido (T) también podrían añadirse en diferentes momentos antes y después del brote de microvasos. Además, las células (C), productos (P) o tejido (T) podrían añadirse antes y después de la formación de redes de microvasos complejos entre uno o más vasos precursores. En más realizaciones adicionales, podría sembrarse un canal con células endoteliales para formar un vaso precursor mientras que podría sembrarse un segundo canal con células cancerosas o células parenquimáticas o células estromáticas para modelos tisulares o ingeniería tisular. Además, se reconocería que podría sembrarse una amplia mezcla de canales con diversos tipos celulares que podrían ensayarse (por ejemplo, EC-arteriales, EC-venosas, EC linfáticas, células parenquimáticas del hígado u otros tejidos).

Con referencia ahora conjuntamente a la FIG. 26A y la FIG. 26B, se muestra una realización que imita la angiogénesis inducida por células. En la FIG. 26A se muestra una imagen de campo brillante de dos canales de colágeno de un CPD 2600, con uno sembrado con HUVEC que ha formado un vaso precursor de brote 2604 y el segundo sembrado con células de cáncer de mama 2608 de la línea celular BT474. El vaso precursor de HUVEC muestra brotes 2610, 2620, 2630, 2640 que crecen hacia las células de cáncer de mama representativas del potencial angiogénico de los productos bioactivos que pueden liberarse de las células cancerosas. En la FIG. 26B, se muestra una imagen correspondiente de microscopía de fluorescencia de los mismos microvasos. Las HUVEC se tiñeron con un colorante 2650 y las células de cáncer de mama se tiñeron con un colorante celular diferente 2660 antes de la siembra (indicador celular verde CMF-DA e indicador celular naranja, CRMA, respectivamente, color no representado). Por tanto, los brotes 2610, 2620, 2630 y 2640 que crecen desde el vaso precursor de HUVEC son de origen endotelial y podrían controlarse para los efectos angiogénicos y angiostáticos.

#### Referencias

- Ades. E. W., F. J. Candal, *et al.* (1992). "HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line." *J Invest Dermatol* 99(6): 683-90,  
Aird, W. C. (2007). "Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds." *Circ Res*

- 100(2): 174-90.
- Akhtar, N., E. B. Dickerson, *et al.* (2002) "The sponge/Matrigel angiogenesis assay." *Angiogenesis* 5(1-2): 75-80.
- Algire, G. H., H. W. Chalkley, *et al.* (1945) "Vascular reactions of normal and malignant tissues *in vivo*. I. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants." *J Natl Cancer Inst* 6: 73-85.
- 5 Andrade, S. P., R. D. Machado, *et al.* (1997). "Sponge-induced angiogenesis in mice and the pharmacological reactivity of the neovasculature quantitated by a fluorimetric method." *Microvasc Res* 54(3): 253-61.
- Arthur, W. T., R. B. Vernon, *et al.* (1998). "Growth factors reverse the impaired sprouting of microvessels from aged mice." *Microvasc Res* 55(3): 260-70.
- Ausprunk, D. H., D. R. Knighton, *et al.* (1974). "Differentiation of vascular endothelium in the chick chorioallantois: a structural and autoradiographic study." *Dev Biol* 38(2): 237-48.
- 10 Bazzoni, G. y E. Dejana (2004). "Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis." *Physiol Rev* 84(3): 869-901.
- Bell, S. E., A. Mavila, *et al.* (2001). "Differential gene expression during capillary morphogenesis in 3D collagen matrices: regulated expression of genes involved in basement membrane matrix assembly, cell cycle progression, cellular differentiation and G-protein signaling." *J Cell Sci* 114(Pt 15): 2755-73.
- 15 Benson, D. A., I. Karsch-Mizrachi, *et al.* (2008). "Genbank." *Nucl Acids Res.* 36(suppl 1): D25-30.
- Bouis, D., G. A. Hospers, *et al.* (2001). "Endothelium *in vitro*: a review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research." *Angiogenesis* 4(2): 91-102.
- Clark, E. R. y E. L. Clark (1939). "Microscopic observations non the growth of blood capillaries in the living mammal." *Am J Anat* 64: 251-301
- 20 Davis, G. E., K. J. Bayless, *et al.* (2002). "Molecular basis of endothelial cell morphogenesis in three-dimensional extracellular matrices." *Anat Rec* 268(3): 252-75.
- Davis, G. E. y C. W. Camarillo (1996). "An alpha 2 beta 1 integrin-dependent pinocytic mechanism involving intracellular vacuole formation and coalescence regulates capillary lumen and tube formation in three-dimensional collagen matrix." *Exp Cell Res* 224(1): 39-51.
- 25 Edgell, C. J., C. C. McDonald, *et al.* (1983). "Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization." *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(12): 3734-7.
- Elsdale, T. y J. Bard (1972). "Collagen substrata for studies on cell behavior." *Cell Biol* 54(3): 626-37.
- Feder, J., J. C. Marasa, *et al.* (1983). "The formation of capillary-like tubes by calf aortic endothelial cells grown *in vitro*." *J Cell Physiol* 116(1): 1-6.
- 30 Fishman, J. A., G. B. Ryan, *et al.* (1975). "Endothelial regeneration in the rat carotid artery and the significance of endothelial denudation in the pathogenesis of myointimal thickening." *Lab Invest* 32(3): 339-51.
- Folkman, J. y C. Haudenschild (1980). "Angiogenesis *in vitro*." *Nature* 288(5791): 551-6.
- Folkman, J., C. C. Haudenschild, *et al.* (1979), "Long-term culture of capillary endothelial cells." *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 76(10): 5217-21.
- 35 French, B., N. Lindemann, *et al.* (2001). "*In vitro* model of a vascular stroma for the engineering of vascularized tissues." *Int J Oral Maxillofac Surg* 30(5): 414-20.
- French, B., K Zuckmantel, *et al.* (2008). "Maturation of capillary-like structures in a tube-like construct in perfusion and rotation culture." *Int J Oral Maxillofac Surg* 37(5): 459-66.
- 40 Gale, N. W., P. Baluk, *et al.* (2001). "Ephrin-B2 selectively marks arterial vessels and neovascularization sites in the adult, with expression in both Endothelial and smooth-muscle cells." *Dev Biol* 230(2): 151-60.
- Gerety, S. S., H. U. Wang, *et al.* (1999). "Symmetrical mutant phenotypes of the receptor EphB4 and its specific transmembrane ligand ephrin-B2 in cardiovascular development." *Mol Cell* 4(3): 403-14.
- Gimbrone, M. A., Jr. (1976). Culture of vascular endothelium. *Prog Hemost Thromb.* 3: 1-28.
- 45 Gimbrone, M. A., Jr., R. S. Cotran, *et al.* (1974). "Human vascular endothelial cells in culture. Growth and DNA synthesis." *J Cell Biol* 60(3): 673-84.
- Gimbrone, M. A., Jr., R. S. Cotran, *et al.* (1974). "Tumor growth and neovascularization: an experimental model using the rabbit cornea." *J Natl Cancer Inst* 52(2): 413-27.
- Greenblatt, M. y P. Shubi (1968). "Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber techniques." *J Natl Cancer Inst* 41(1): 111-24.
- 50 Hiraoka, N., E. Allen, *et al.* (1998). "Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins." *Cell* 95(3): 365-77.
- Hohenwarter, O., A. Jakoubek, *et al.* (1994). "Expression of SV40 tumour antigens enables human endothelial cells to grow independently from foetal calf serum and exogenous growth factors." *J Biotechnol* 34(2): 205-11.
- 55 Hotary, K., E. Allen, *et al.* (2000). "Regulation of cell invasion and morphogenesis in a three-dimensional type 1 collagen matrix by membrane-type matrix metalloproteinases 1, 2, and 3." *J Cell Biol* 149(6): 1309-23.
- Hoying, J. B., C. A. Boswell, *et al.* (1996). "Angiogenic potential of microvessel fragments established in three-dimensional collagen gels." *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 32(7): 409-19.
- Jaffe, E. A., R. L. Nachman, *et al.* (1973). "Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria." *J Clin Invest* 52(11): 2745-56.
- 60 Jozaki, K., P. T. Marucha, *et al.* (1990). "An *in vitro* model of cell migration: evaluation of vascular endothelial cell migration" *Anal Biochem* 190(1): 39-47.
- Kang, J. y I. Lee (2006). "TuJ1 (class III beta-tubulin) as phenotypic marker of lymphatic and venous valves." *Cardiovasc Pathol* 15(4): 218-21.
- 65 Koike, T., R. B. Vernon, *et al.* (2003). "Inhibited angiogenesis in aging: a role for TIMP-2." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 58(9): B798-805.

- Krebs, L T., Y. Xue, *et al.* (2000). "Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice." *Genes Dev* 14(11): 1343-52.
- Kubota, Y., H. K. Kleinman, *et al.* (1988). "Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures" *J Cell Biol* 107(4): 1589-98.
- 5 Kuzuya, M. y J. L. Kinsella (1994). "Induction of endothelial cell differentiation *in vitro* by fibroblast-derived soluble factors." *Exp Cell Res* 215(2): 310-8.
- Lindner, V., C. Booth, *et al.* (2001). "Members of the Jagged/Notch gene families are expressed in injured arteries and regulate cell phenotype via alterations in cell matrix and cell-cell interaction." *Am J Pathol* 159(3): 875-83.
- 10 Lindsell, C. E., J. Boulter, *et al.* (1996). "Expression patterns of Jagged, Delta1, Notch1, Notch2, and Notch3 genes identify ligand-receptor pairs that may function in neural development." *Mol Cell Neurosci* 8(1): 14-27
- Maciag, T., J. Kadish, *et al.* (1982). "Organizational behavior of human umbilical vein endothelial cells." *J Cell Biol* 94(3): 511-20.
- Madri, J. A. (1982). "Endothelial cell-matrix interactions in hemostasis." *Prog Hemost Thromb* 6: 1-24.
- 15 Madri, J. A. y B. M. Pratt (1986). "Endothelial cell-matrix interactions: *in vitro* models of angiogenesis. *J Histochem Cytochem* 34(1): 85-91.
- Madri, J. A., B. M. Pratt, *et al.* (1988). "Phenotypic modulation of endothelial cells by transforming growth factor-beta depends upon the composition and organization of the extracellular matrix." *J Cell Biol* 106(4): 1375-84.
- Madri, J. A. y K. S. Stenn (1982). "Aortic endothelial cell migration. I. Matrix requirements and composition." *Am J Pathol* 106(2): 180-6.
- 20 Manoussaki, D., S. R. Lubkin, *et al.* (1996). "A mechanical model for the formation of vascular networks *in vitro*" *Acta Biotheor* 44(3-4): 271-82,
- Marx, M., R. A. Perlmutter, *et al.* (1994). "Modulation of platelet-derived growth factor receptor expression in microvascular endothelial cells during *in vitro* angiogenesis." *J Clin Invest* 93(1): 131-9.
- 25 Merwin, J. R., J. M. Anderson, *et al.* (1990). "Transforming growth factor beta 1 modulates extracellular matrix organization and cell-cell junctional complex formation during *in vitro* angiogenesis." *J Cell Physiol* 142(1): 117-28.
- Montesano, R. y L. Orci (1985) "Tumor-promoting phorbol esters induce angiogenesis *in vitro*." *Cell* 42(2): 469-77.
- 30 Montesano, R., L. Orci, *et al.* (1983). "*In vitro* rapid organization of endothelial cells into capillary-like networks is promoted by collagen matrices." *J Cell Biol* 97(5 Pt 1): 1648-52.
- Montesano, R., M. S. Pepper, *et al.* (1993). "Paracrine induction of angiogenesis *in vitro* by Swiss 3T3 fibroblasts." *J Cell Sci* 105 (Pt 4): 1013-24.
- Mori, M., Y. Sadahira, *et al.* (1988). "Capillary growth from reversed rat aortic segments cultured in collagen gel." *Acta Pathol Jpn* 38(12): 1503-12.
- 35 Mukouyama, Y. S., H. P. Gerber, *et al.* (2005). "Peripheral nerve-derived VEGF promotes arterial differentiation via neuropilin 1-mediated positive feedback." *Development* 132(5): 941-52.
- Nakagawa, O., M. Nakagawa, *et al.* (1999). "HRT1, HRT2, and HRT3: a new subclass of bHLH transcription factors marking specific cardiac, somitic, and pharyngeal arch segments." *Dev Biol* 216(1): 72-84.
- 40 Nehls, V. y D. Drenckhahn (1995). "A novel, microcarrier-based *in vitro* assay for rapid and reliable quantification of three-dimensional cell migration and angiogenesis." *Microvasc Res* 50(3): 311-22.
- Nehls, V. y R. Herrmann (1996). "The configuration of fibrin clots determines capillary morphogenesis and endothelial cell migration." *Microvasc Res* 51(3): 347-64.
- Nicosia, R. F., E. Bonanno, *et al.* (1994). "Modulation of angiogenesis *in vitro* by laminin-entactin complex." *Dev Biol* 164(1): 197-206.
- 45 Nicosia, R. F., E. Bonanno, *et al.* (1992). "Large vessel endothelium, switches to a microvascular phenotype during angiogenesis in collagen gel culture of rat aorta." *Atherosclerosis* 95(2-3): 191-9.
- Nicosia, R. F., S. V. Nicosia, *et al.* (1994). "Vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and insulin-like growth factor-1 promote rat aortic angiogenesis *in vitro*." *Am J Pathol* 145(5): 1023-9.
- 50 Nicosia, R. F. y A. Ottinetti (1990). "Modulation of microvascular growth and morphogenesis by reconstituted basement membrane gel in three-dimensional cultures of rat aorta: a comparative study of angiogenesis in matrigel, collagen, fibrin, and plasma clot." *In Vitro Cell Dev Biol* 26(2): 119-28.
- Nicosia, R. F., R. Tchoa, *et al.* (1982). "Histotypic angiogenesis *in vitro*: light microscopic, ultrastructural, and radioautographic studies." *In Vitro* 18(6): 538-49.
- 55 Nicosia, R. F., R. Tchoa, *et al.* (1983). "Angiogenesis-dependent tumor spread in reinforced fibrin clot culture." *Cancer Res* 43(5): 2159-66.
- Nicosia, R. F. y G. P. Tuszynski (1994). "Matrix-bound thrombospondin promotes angiogenesis *in vitro*." *J Cell Biol* 124(1-2): 183-93.
- 60 Passaniti, A., R. M. Taylor, *et al.* (1992). "A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor." *Lab Invest* 67(4): 519-28.
- Pepper, M. S., R. Montesano, *et al.* (1991). "Chondrocytes inhibit endothelial sprout formation *in vitro*: evidence for involvement of a transforming growth factor-beta." *J Cell Physiol* 146(1): 170-9.
- Rosen, E. M., L. Meromsky, *et al.* (1990). "Quantitation of cytokine-stimulated migration of endothelium and epithelium by a new assay using microcarrier beads." *Exp Cell Res* 186(1): 22-31.
- 65 Sage, E. H. y R. B. Vernon (1994). "Regulation of angiogenesis by extracellular matrix: the growth and the glue." *J Hypertens Suppl* 12(10): S145-52.

- Seki, T., J. Yun, *et al.* (2003). "Arterial endothelium-specific activin receptor-like kinase 1 expression suggests its role in arterialization and vascular remodeling." *Circ Res* 93(7): 682-9.
- Shin, D. y D. J. Anderson (2005). "Isolation of arterial-specific genes by subtractive hybridization reveals molecular heterogeneity among arterial endotelial cells." *Dev Dyn* 233(4): 1589-604.
- 5 Takahashi, K., Y. Sawasaki, *et al.* (1990). "Spontaneous transformation and immortalization of human endothelial cells." *In Vitro Cell Dev Biol* 26(3 Pt 1): 265-74.
- Tian, H., S. L. McKnight, *et al.* (1997) "Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in Endothelial cells." *Genes Dev* 11(1): 72-82.
- 10 Torres-Vazquez, J., M. Kamei, *et al.* (2003). "Molecular distinction between arteries and veins." *Cell and Tissue Research* 314(1): 43-59.
- Uyttendaele, H., V. Closson, *et al.* (2000). "Notch4 and Jagged-1 induce microvessel differentiation of rat brain Endothelial cells." *Microvasc Res* 60(2): 91-103.
- Vernon, R. B., J. C. Angello, *et al.* (1992). "Reorganization of basement membrane matrices by celular traction promotes the formation of cellular networks *in vitro*." *Lab Invest* 66(5): 536-47.
- 15 Vernon, R. B. y M. D. Gooden (2002). "New technologies *in vitro* for analysis of cell movement on or within collagen gels." *Matrix Biol* 21(8): 661-9.
- Vernon, R. B., S. L. Lara, *et al.* (1995). "Organized type 1 collagen influences endothelial patterns during "spontaneous angiogenesis *in vitro*": planar cultures as models of vascular development." *In vitro Cell Dev Biol Anim* 31(2): 120-31.
- 20 Vernon, R. B. y E. H. Sage (1999). "A novel, quantitative model for study of Endothelial cell migration and sprout formation within three-dimensional collagen matrices." *Microvasc Res* 57(2): 118-33.
- Villaschi, S. y R. F. Nicosia (1993). "Angiogenic role of endogenous basic fibroblast growth factor released by rat aorta after injury." *Am J Pathol* 143(1): 181-90.
- 25 Wheelock. M. J. y K. R. Johnson (2003). "CADHERINS AS MODULATORS OF CELLULAR PHENOTYPE." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 19(1): 207-235.
- You, L. R., F. J. Lin, *et al.* (2005). "Suppression of Notch signalling by the COUP-TFII transcription factor regulates vein identify." *Nature* 435(7038): 98-104.
- Yuan, L., D. Moyon, *et al.* (2002). "abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice." *Development* 129(20): 4797-806.
- 30 Zimrin., A. B., M. S. Pepper, *et al.* (1996). "An antisense oligonucleotide to the notch ligand jagged enhances fibroblast growth factor-induced angiogenesis *in vitro*." *J Biol Chem* 271(51): 32499-502.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para formar redes de microvasos perfundibles *in vitro*, que comprende las etapas de:
  - 5 moldear una matriz alrededor de un mandril en una cámara en un dispositivo de perfusión de cultivos; retirar el mandril para crear un canal dentro de la matriz, en donde el mandril se retira por extracción o por descomposición;
  - sembrar células endoteliales en al menos un canal dentro de la matriz;
  - 10 activar la competencia de las células endoteliales para brotar como microvasos desde vasos precursores, en donde la competencia para el brote se desencadena por la densidad de siembra;
  - perfundir el al menos un canal con al menos un medio de perfusión para permitir que las células formen al menos un vaso precursor;
  - 15 incubar y perfundir el al menos un vaso precursor con al menos un medio de perfusión para mantener la viabilidad y proporcionar el brote de microvasos desde el al menos un vaso precursor en la matriz adyacente; y cultivar los microvasos de brote hasta que los microvasos hayan formado redes.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la mayoría de las células endoteliales están en contacto célula a célula entre sí.
- 20 3. El método de la reivindicación 1, en el que las células endoteliales están presentes a al menos 250 células por mm cuadrado de canal, por ejemplo, a una densidad de 250 a 2000 células por mm cuadrado de canal.
4. El método de la reivindicación 1, en el que los microvasos, que brotan desde los vasos precursores, se anastomosan para formar redes de microvasos.
- 25 5. El método de la reivindicación 1, en el que los vasos precursores sustentan el crecimiento de al menos un tipo celular de un tejido incluido dentro de la matriz.
6. El método de la reivindicación 5, en el que los vasos precursores son series 3D de vasos precursores.
- 30 7. El método de la reivindicación 1, en el que se siembra al menos un tipo celular adicional en el al menos un canal dentro de la matriz, en donde el al menos un tipo celular adicional se elige del grupo que consiste en células de músculo liso, células fibroblásticas, pericitos, células progenitoras, células madre, células parenquimáticas, células estromáticas, células musculares, células hepáticas, células pulmonares, células cutáneas, células epiteliales,
- 35 células humanas, células animales, células eucariotas, células modificadas por ingeniería genética, células modificadas genéticamente, células enfermas, células infectadas por virus, células cancerosas y combinaciones de las mismas.
8. El método de la reivindicación 1, en el que las células endoteliales son de líneas celulares endoteliales y en el que las líneas celulares endoteliales se eligen del grupo que consiste en líneas celulares endoteliales microvasculares, líneas endoteliales macrovasculares y líneas celulares endoteliales procedentes de individuos.
- 40 9. El método de la reivindicación 7, en el que las células liberan productos bioactivos en el medio de perfusión, o en la matriz, o en ambos.
- 45 10. El método de la reivindicación 1, en el que las células endoteliales contienen marcadores moleculares modificados por ingeniería genética para endotelio arterial o las células endoteliales contienen marcadores moleculares modificados por ingeniería genética para endotelio linfático, o las células endoteliales contienen marcadores moleculares modificados por ingeniería genética para endotelio venoso.
- 50 11. El método de la reivindicación 1, en el que al menos un canal se puebla con células endoteliales y al menos un canal se puebla con al menos un tipo celular no endotelial.
12. El método de la reivindicación 1, en el que la siembra del al menos un canal es por un proceso seleccionado del grupo que consiste en inyección de células en el canal de matriz, y adhesión previa de células al mandril, y por una combinación de adhesión previa de células al mandril e inyección de células en el canal de matriz.
- 55 13. El método de la reivindicación 1, en el que el al menos un canal en la matriz es de 20 micrómetros a 500 micrómetros de diámetro, o de 500 micrómetros a 5,5 mm de diámetro.
- 60 14. El método de la reivindicación 1, en el que la matriz comprende material seleccionado del grupo que consiste en fibrina, colágeno, subtipos de colágeno, gelatina, membrana basal gelificada, agar, agarosa, alginato, proteínas de membrana basal, proteínas de matriz extracelular, gel de sílice y células.
- 65 15. El método de la reivindicación 14, en el que las proteínas de membrana basal se eligen del grupo que consiste en colágeno de tipo IV, perlecano, laminina, integrinas, enactinas, distroglicanos, fibras de colágeno de tipo VII y

microfibrillas de colágeno de tipo VII.

- 5 16. El método de la reivindicación 14, en el que las proteínas de matriz extracelular se seleccionan del grupo que consiste en proteoglicanos, glucosaminoglicanos, proteoglicanos de sulfato de heparina, proteoglicanos de sulfato de condroitina, proteoglicanos de sulfato de queratina, ácido hialurónico, colágeno, fibronectina, vitronectina, elastina y laminina.
- 10 17. El método de la reivindicación 1, en el que la matriz se puebla con células endoteliales y células adicionales elegidas del grupo que consiste en células de músculo liso, pericitos, células fibroblásticas, células progenitoras, células madre, células musculares, células hepáticas, células pulmonares, células cutáneas, células epiteliales, células humanas, células animales, células vegetales, células eucariotas, células parenquimáticas, células estromáticas, células modificadas por ingeniería genética, células modificadas genéticamente, células enfermas, células infectadas por virus, células cancerosas y combinaciones de las mismas.
- 15 18. El método de la reivindicación 1, en el que se incluye al menos un tejido en la matriz y en el que el al menos un tejido se elige del grupo que consiste en tejido sano, tejido enfermo, tejido canceroso y tejido modificado por ingeniería genética.
- 20 19. El método de la reivindicación 1, en el que el flujo del al menos un medio de perfusión se aproxima al flujo *in vivo* de los vasos capilares.
- 25 20. El método de la reivindicación 1, en el que el flujo del al menos un medio de perfusión fluye preferentemente a través de la red de microvasos que conecta los vasos precursores disminuyendo el flujo en un vaso precursor y aumentando la resistencia en otro vaso precursor.
- 30 21. El método de la reivindicación 1, en el que el al menos un medio de perfusión comprende un medio de crecimiento celular que tiene componentes suplementarios seleccionados del grupo que consiste en factores angiogénicos, factores angiostáticos, suero, ésteres de forbol y factores de crecimiento.
- 35 22. El método de la reivindicación 1, en el que la oxigenación del al menos un medio de perfusión es sustancialmente por difusión a través de la matriz.
23. Un método para formar redes de microvasos perfundibles *in vitro* en un dispositivo de perfusión de cultivos, que comprende las etapas de:
- 40 moldear una matriz alrededor de mandriles en una cámara en un dispositivo de perfusión de cultivos; retirar los mandriles para crear canales dentro de la matriz; adherir un conducto a al menos un acceso de entrada y de salida; sembrar células endoteliales en los canales a través del conducto;
- 45 distribuir las células dentro de los canales; perfundir el dispositivo de perfusión de cultivos llenando los accesos de entrada y cebando el al menos un acceso de entrada y de salida; incubar el dispositivo de perfusión de cultivos para formar vasos precursores, en donde se produce el brote de microvasos desde los vasos precursores, en donde las células están presentes en un valor mínimo para el brote de al menos 250 células adheridas por mm cuadrado de canal; y
- 50 formar redes de microvasos perfundibles incubando el dispositivo de perfusión de cultivo.
24. Un método para seleccionar productos angiogénicos y angiostáticos, que comprende las etapas de:
- 55 formar redes de microvasos perfundibles *in vitro* en un dispositivo de perfusión de cultivos de acuerdo con el método de la reivindicación 23; añadir candidatos a posiciones dentro de la matriz, en donde los candidatos se seleccionan del grupo que consiste en células, productos y tejido; perfundir e incubar el dispositivo de perfusión; y medir el crecimiento 3D de las redes de microvasos en respuesta a los candidatos añadidos.

FIG. 1A

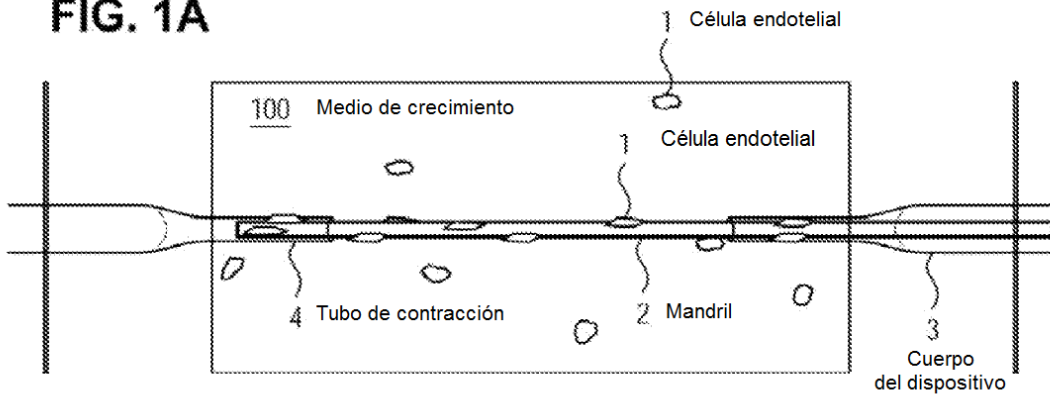


FIG. 1B

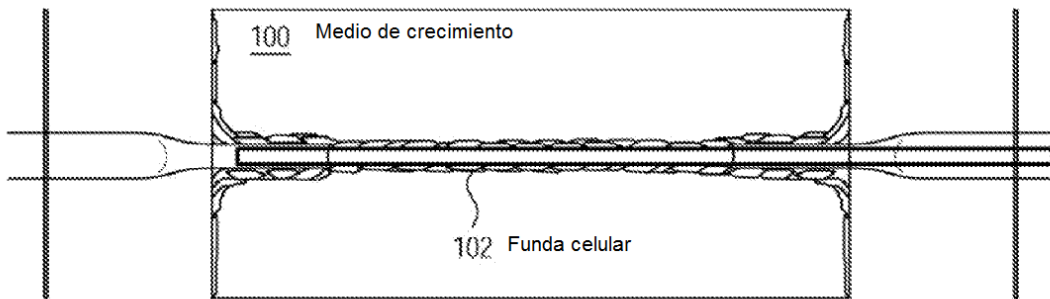
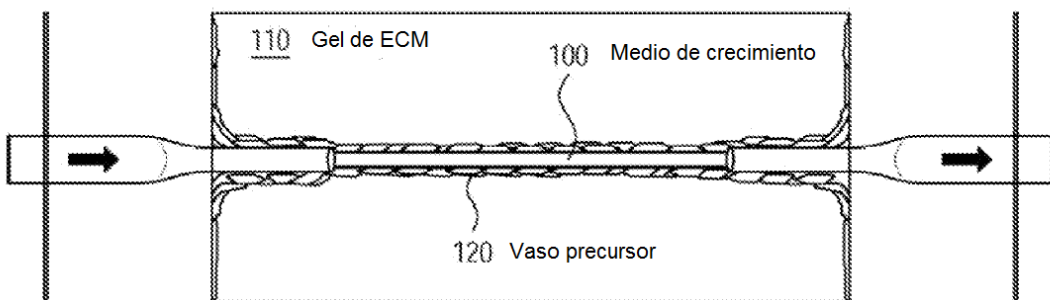
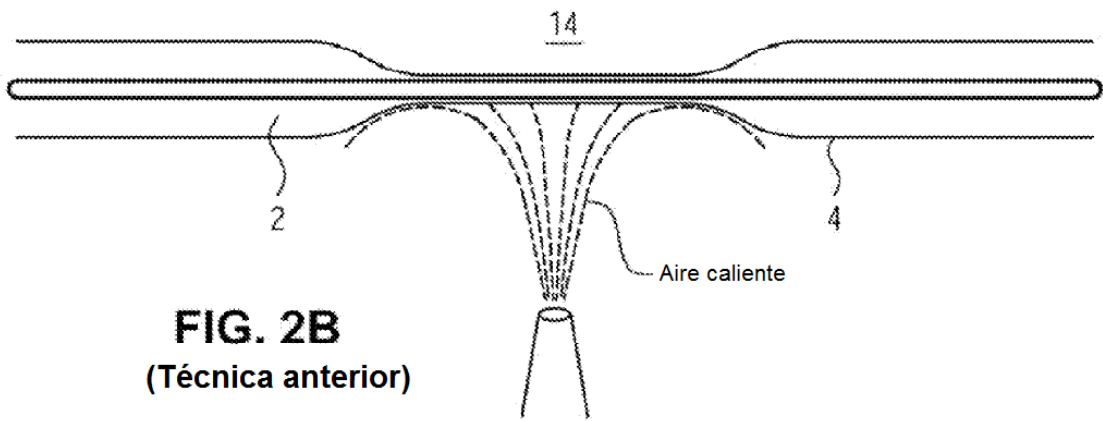
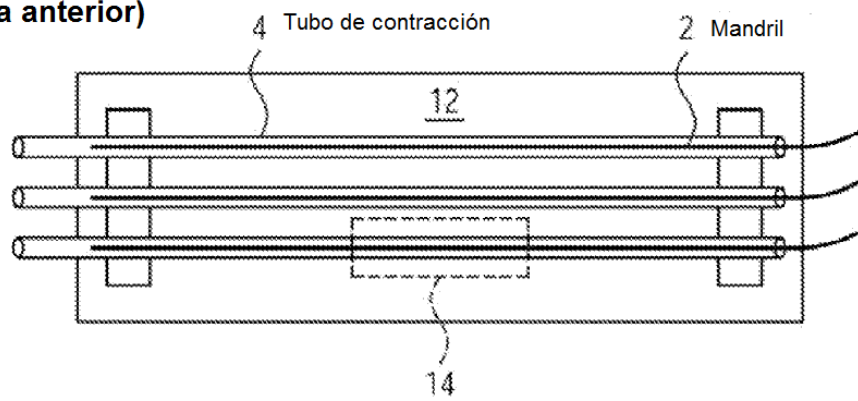


FIG. 1C

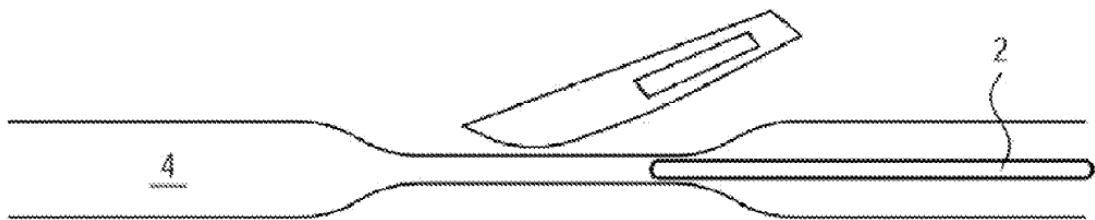




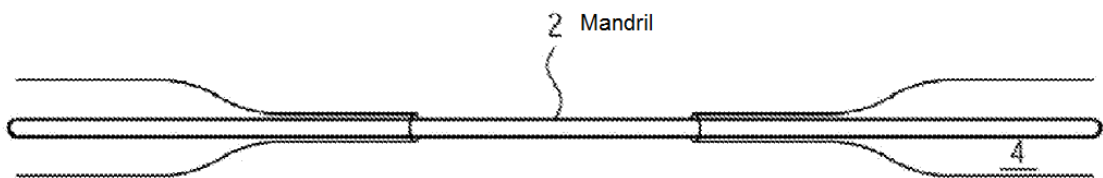
**FIG. 2A**  
(Técnica anterior)



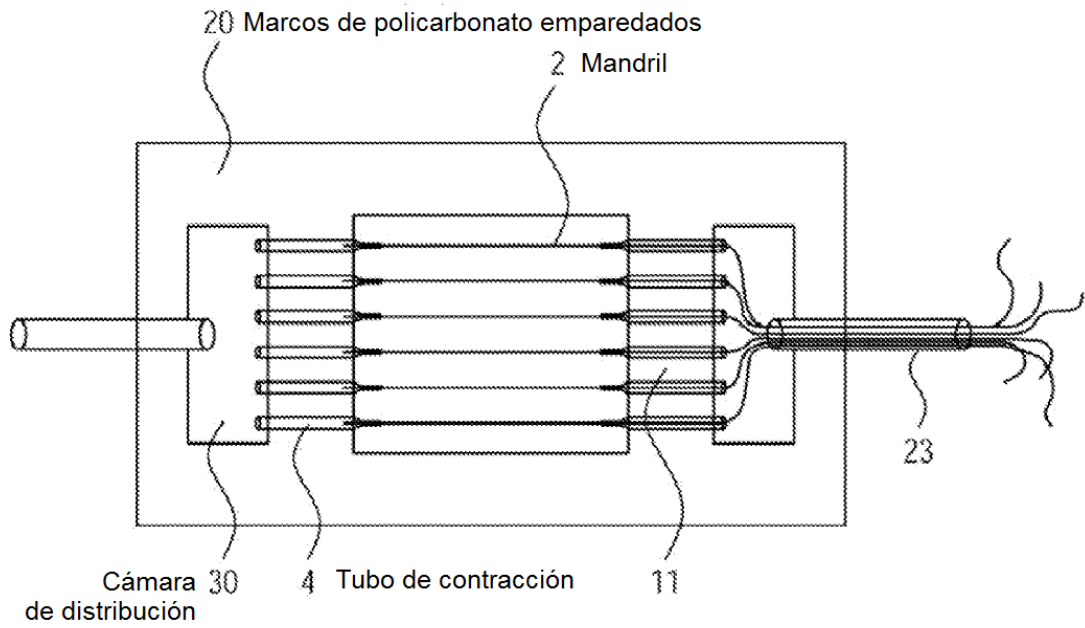
**FIG. 2B**  
(Técnica anterior)



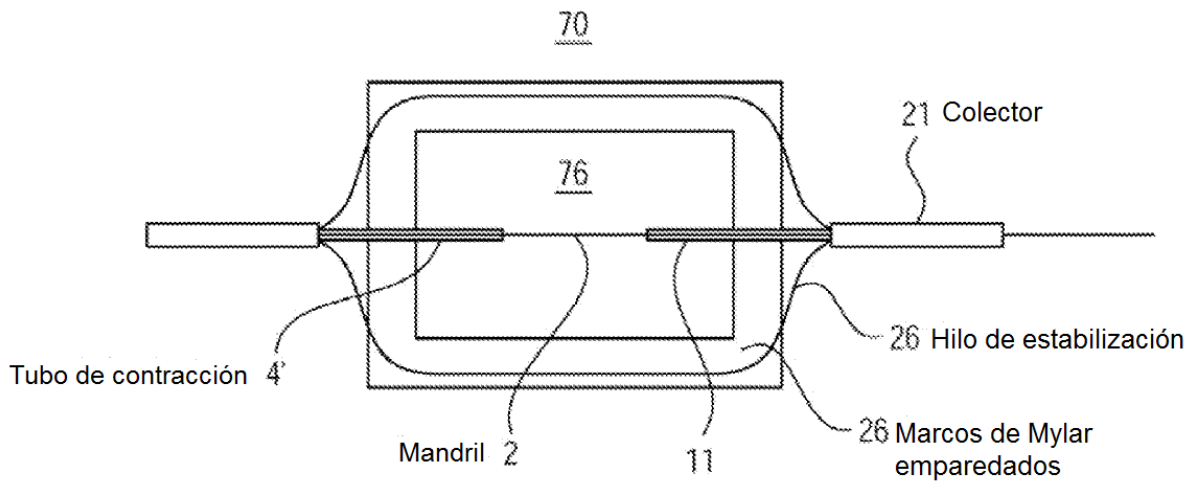
**FIG. 2C**  
(Técnica anterior)



**FIG. 2D**  
(Técnica anterior)



**FIG. 3A**  
(Técnica anterior)



**FIG. 3B**

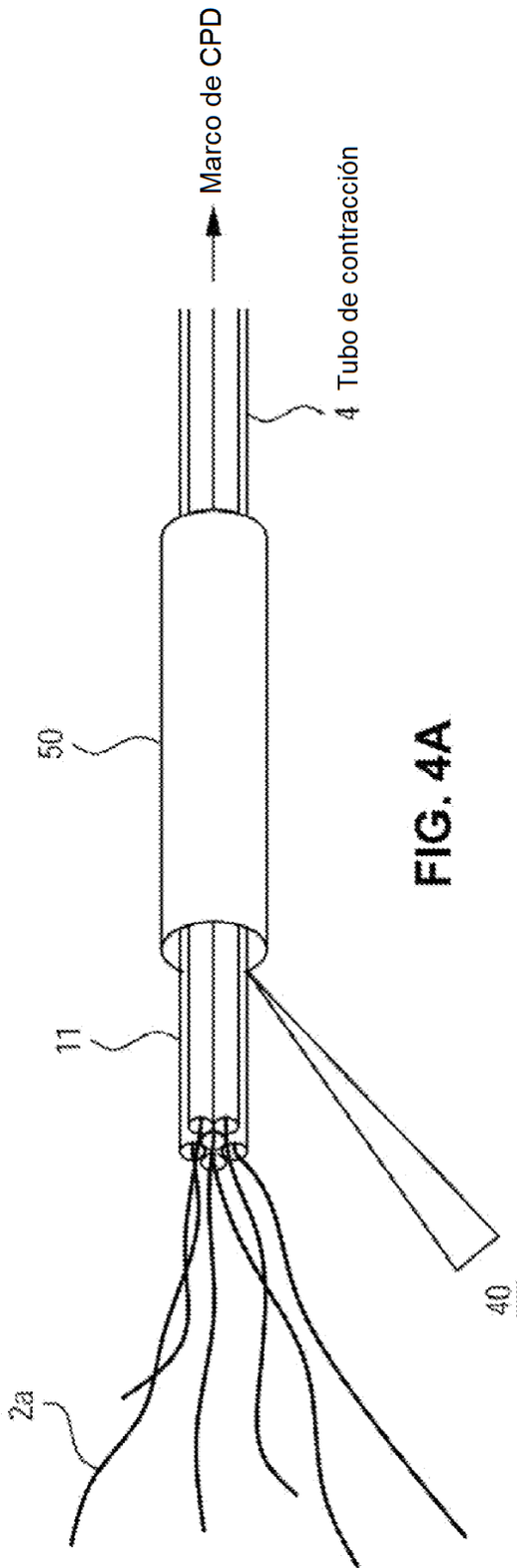


FIG. 4A

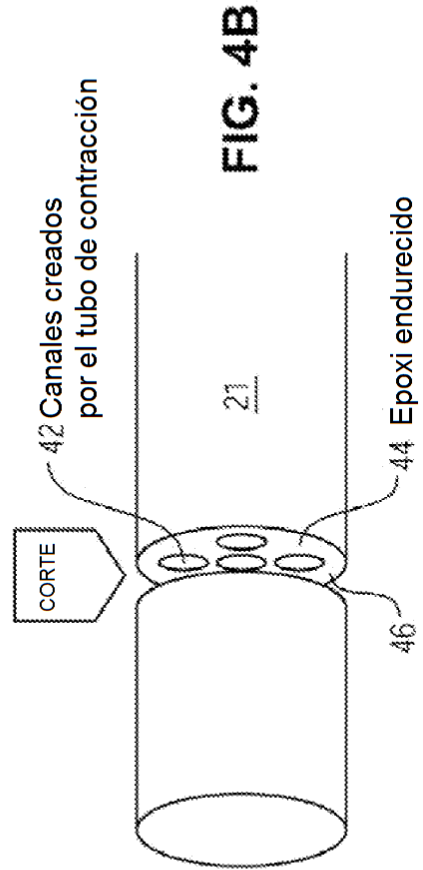
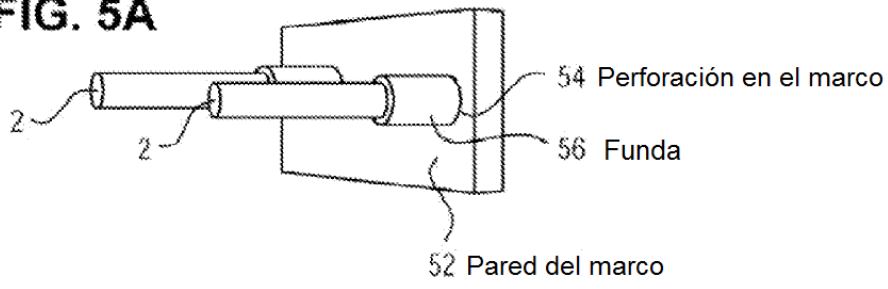
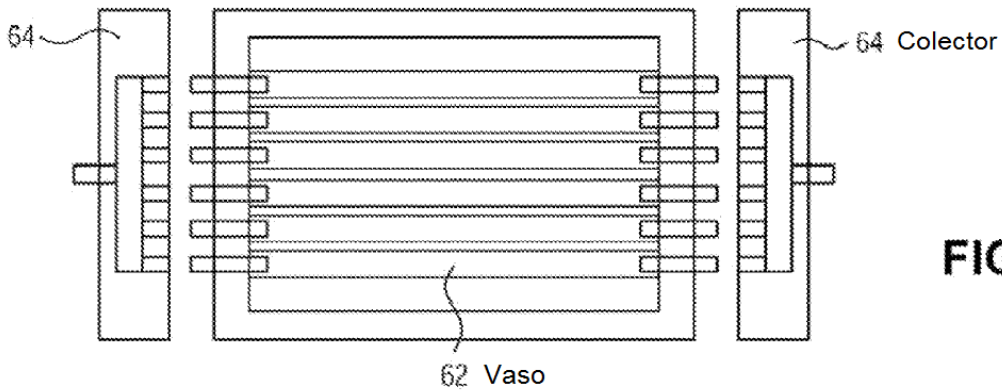
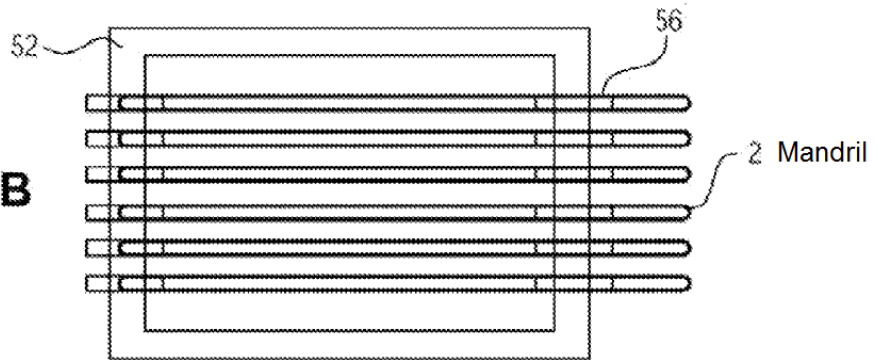


FIG. 4B

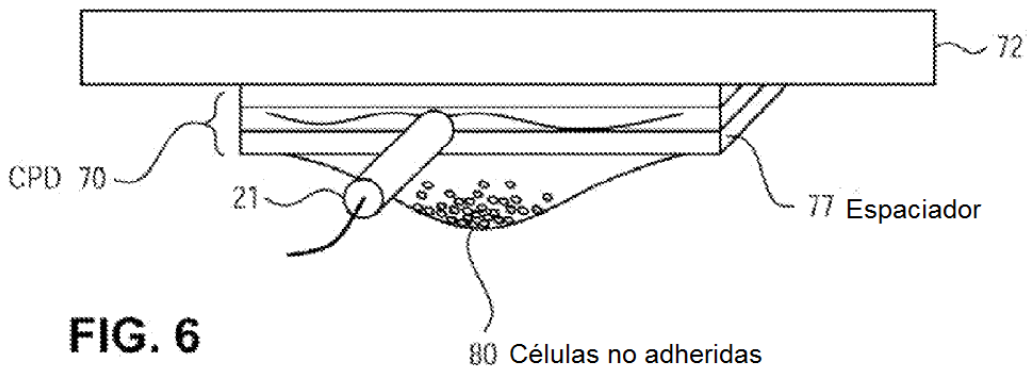
**FIG. 5A**



**FIG. 5B**



**FIG. 5C**



**FIG. 6**

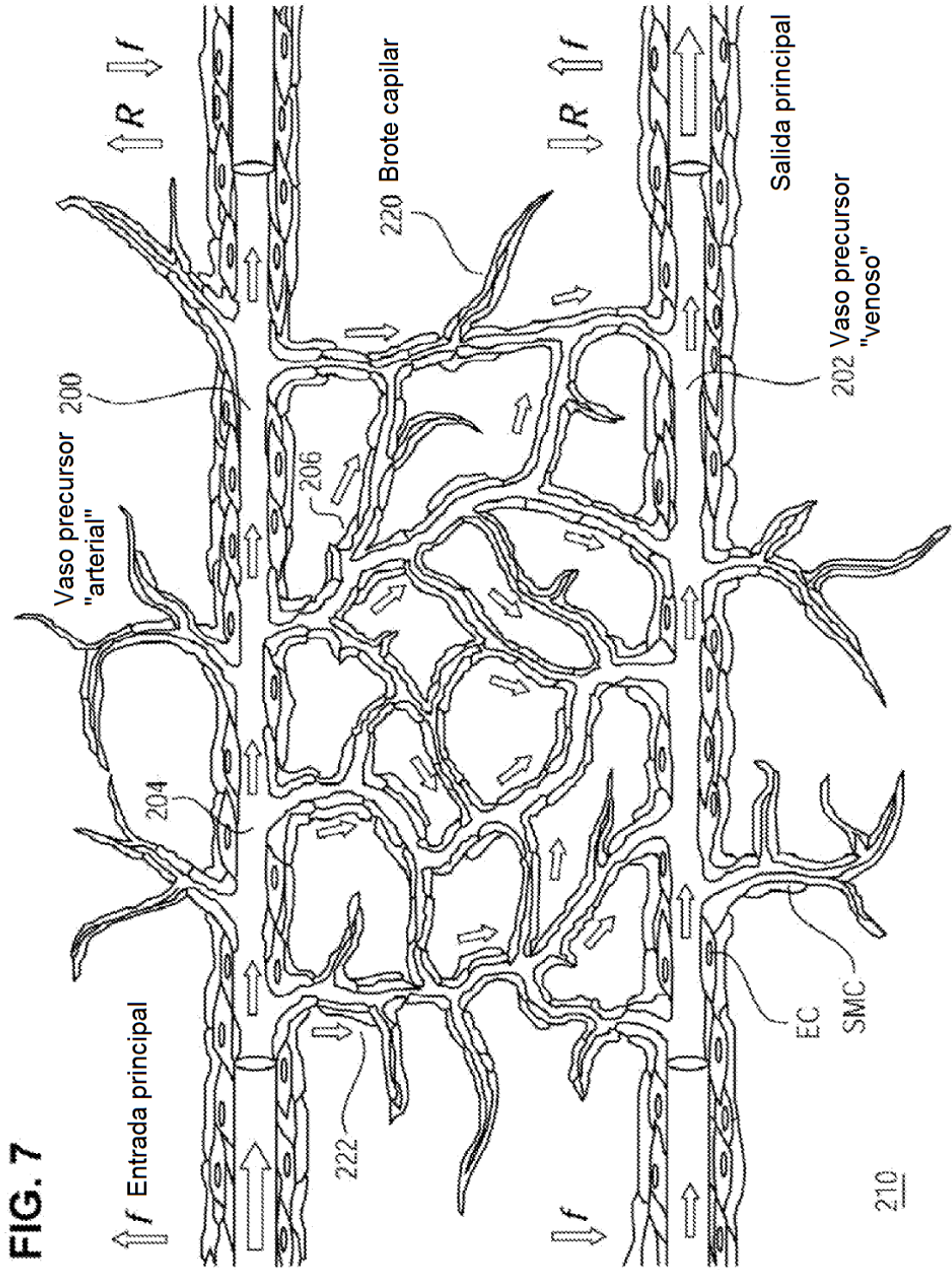


FIG. 7

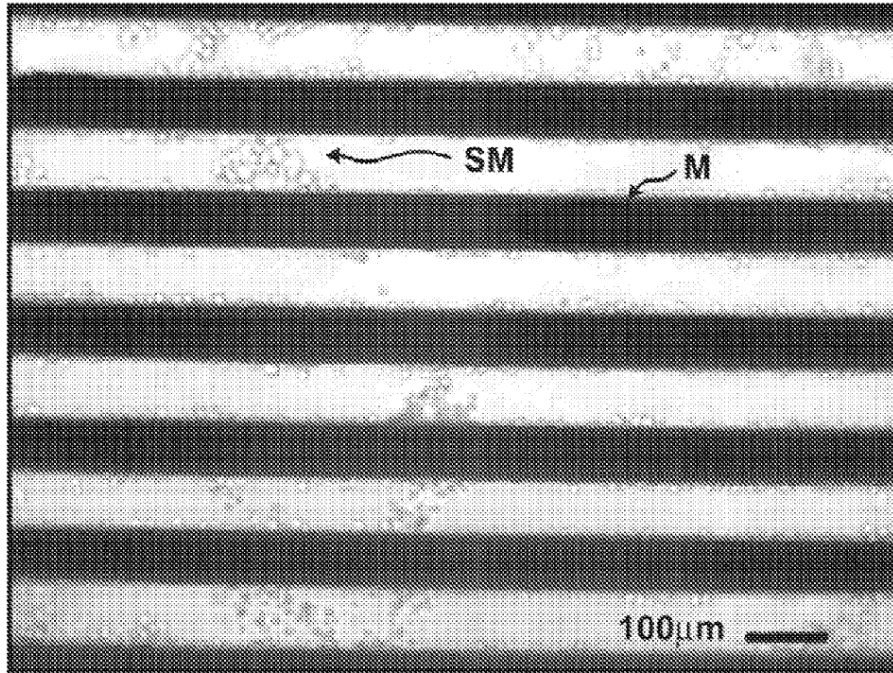


FIG. 8a

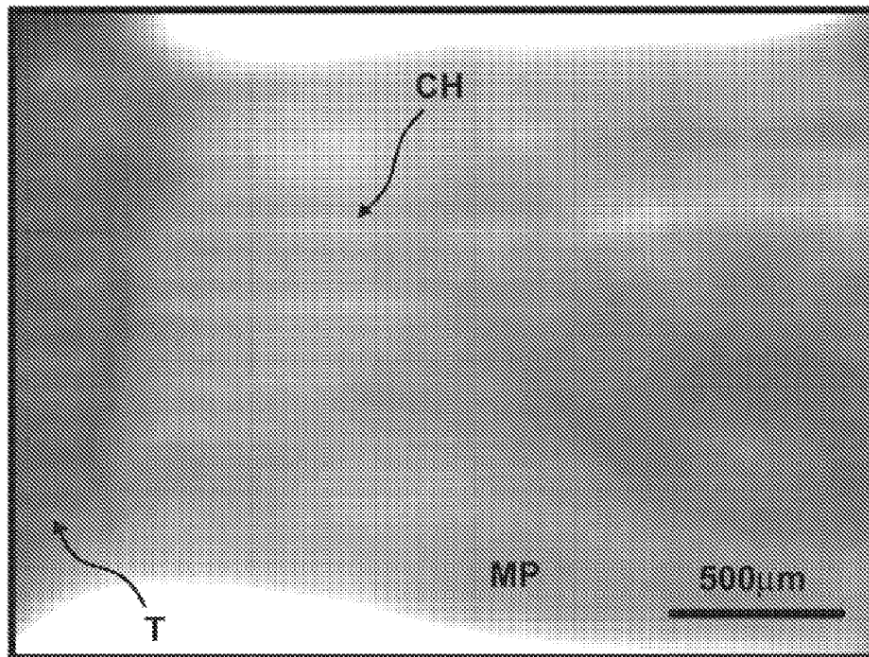
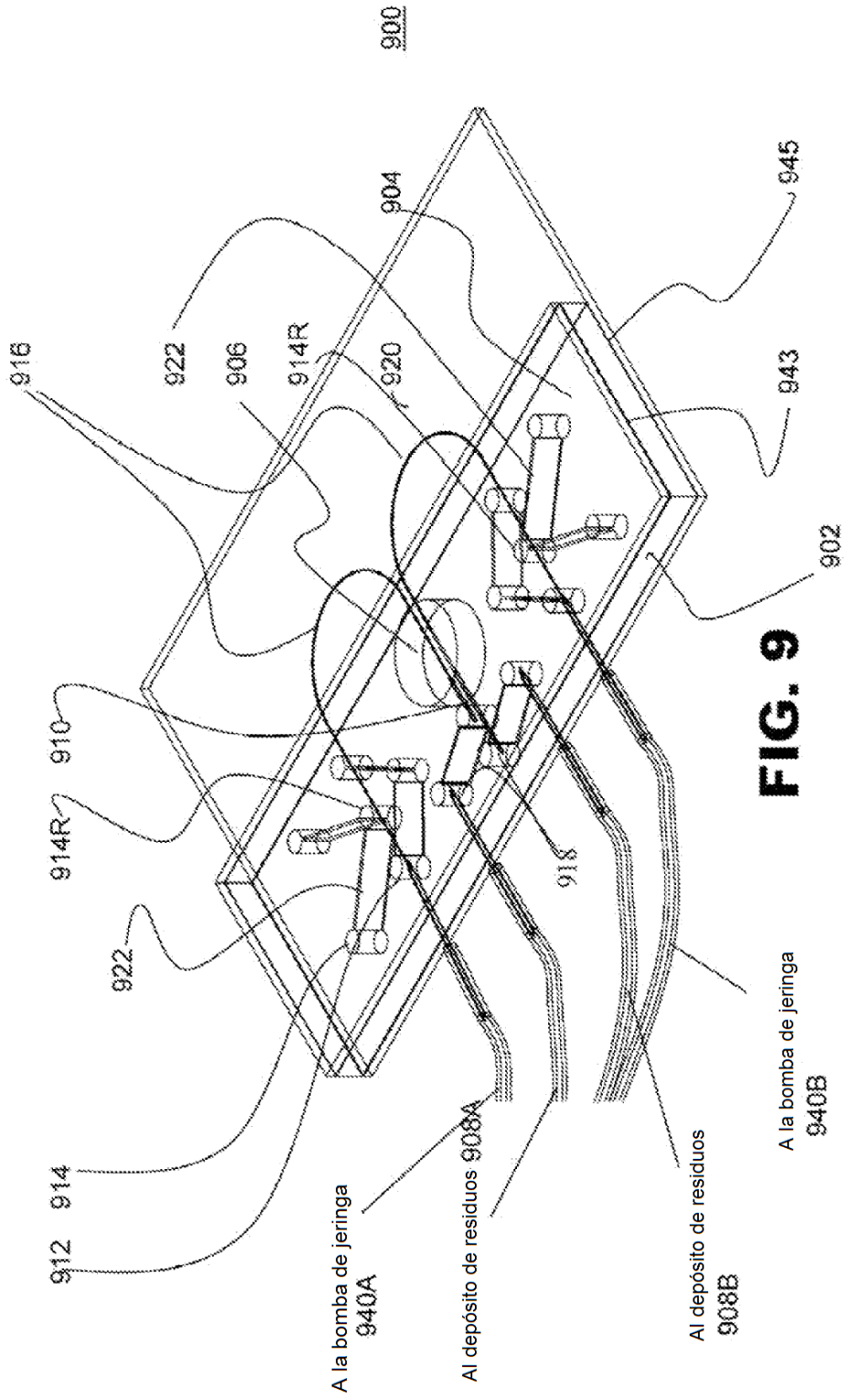


FIG. 8b





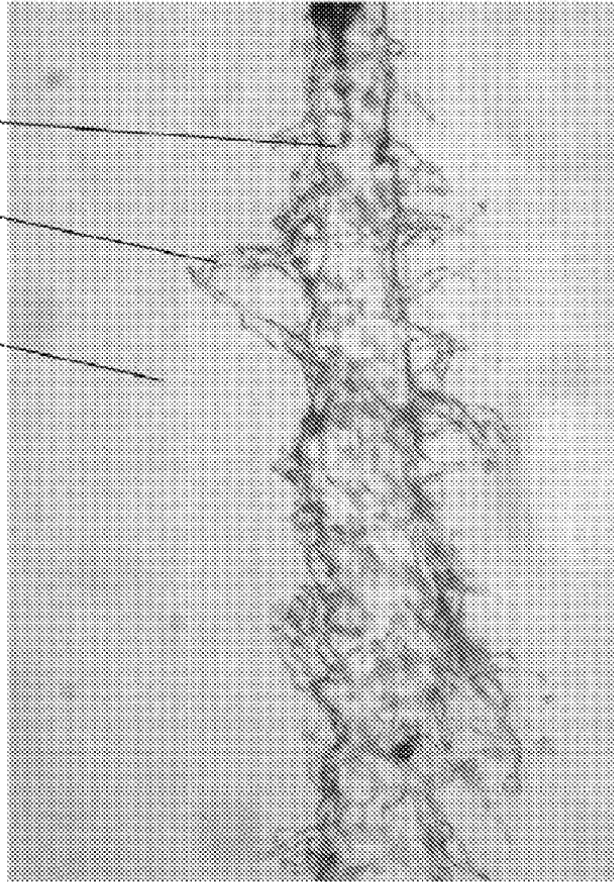
**FIG. 9**

**FIG. 10**

1050

1052

1054

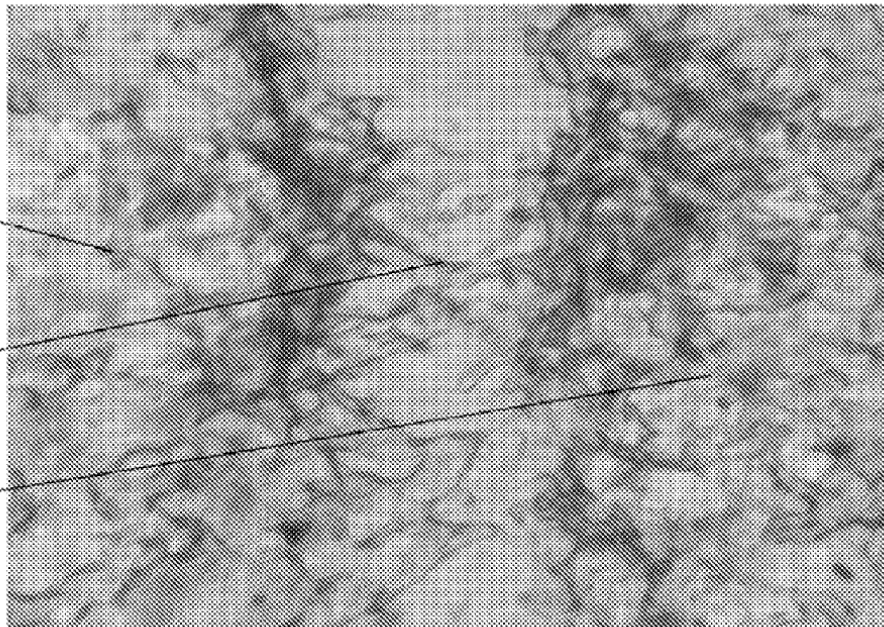


**FIG. 11**

1102

1106

1104





**FIG. 12**

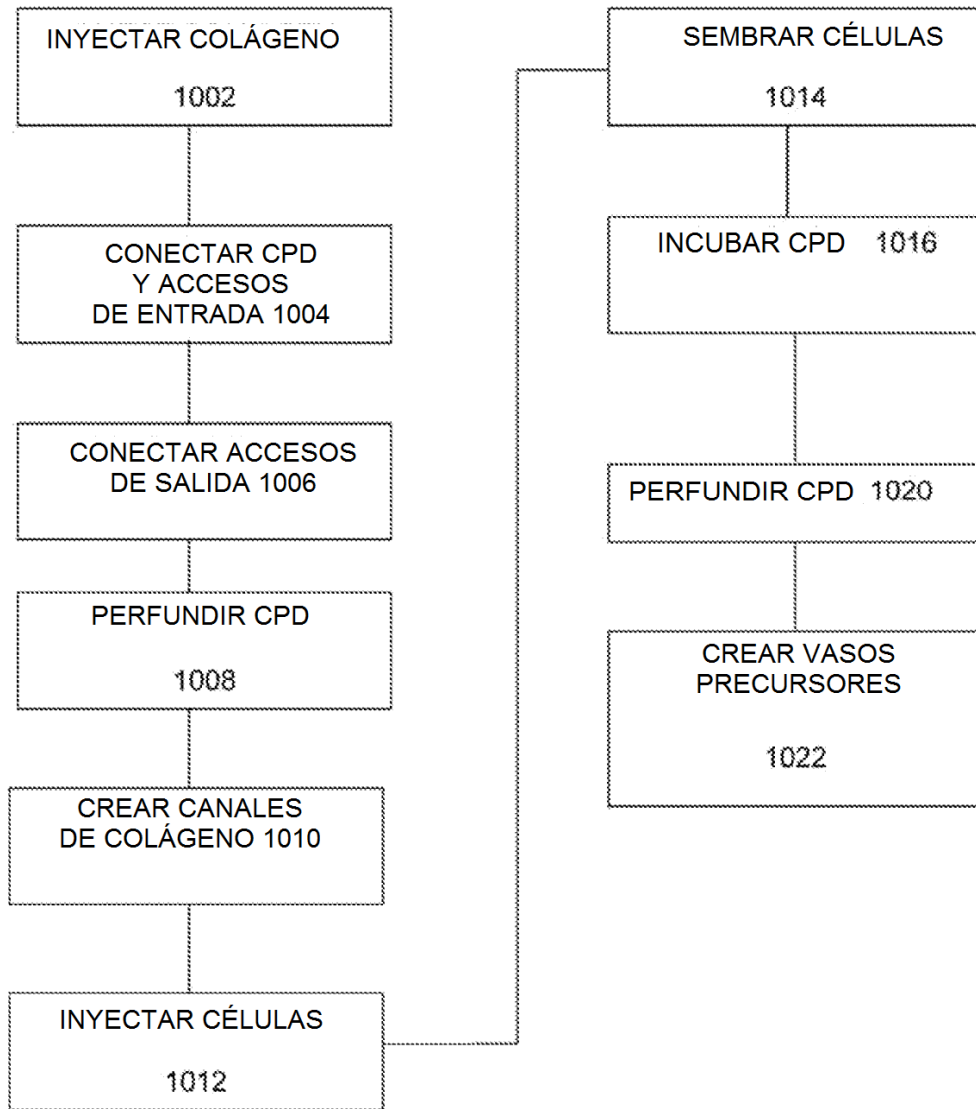


FIG. 13A

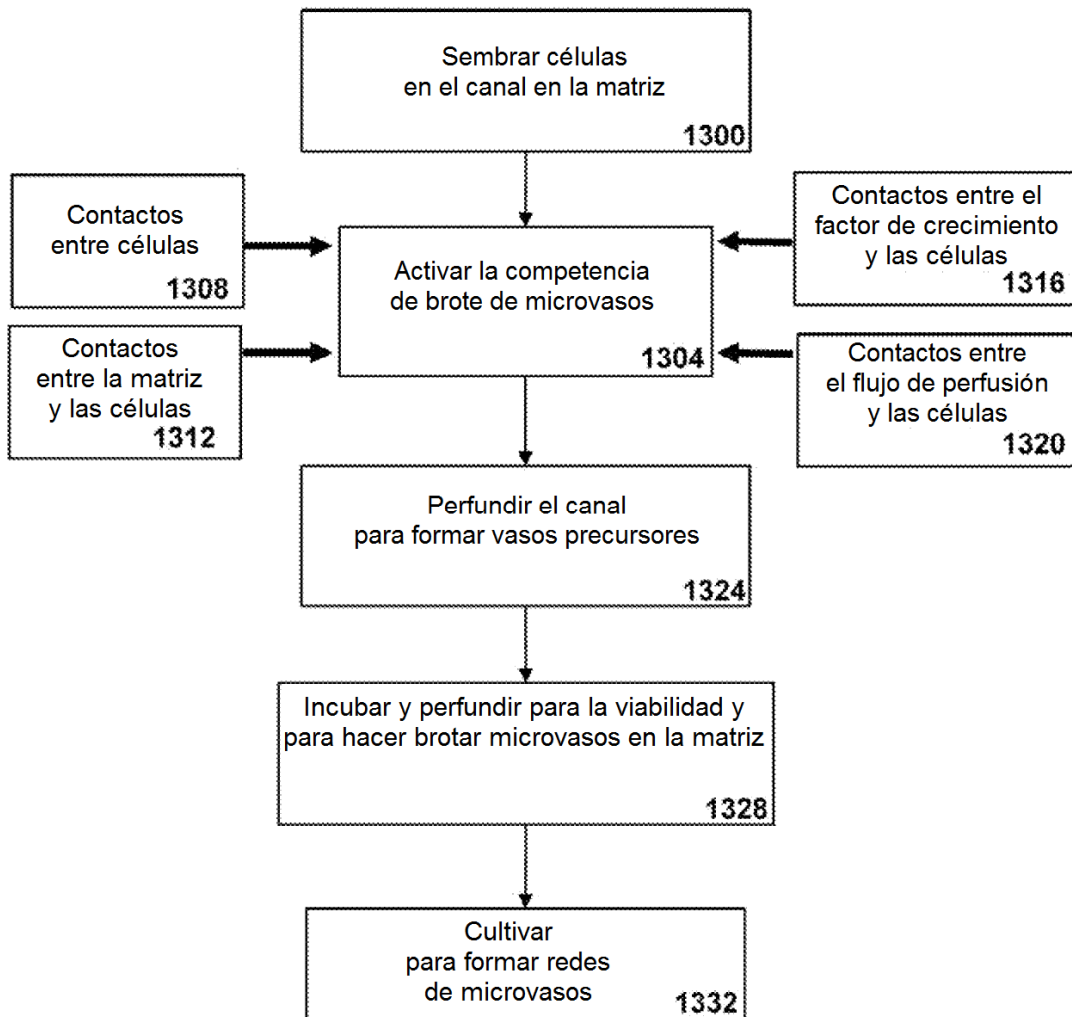
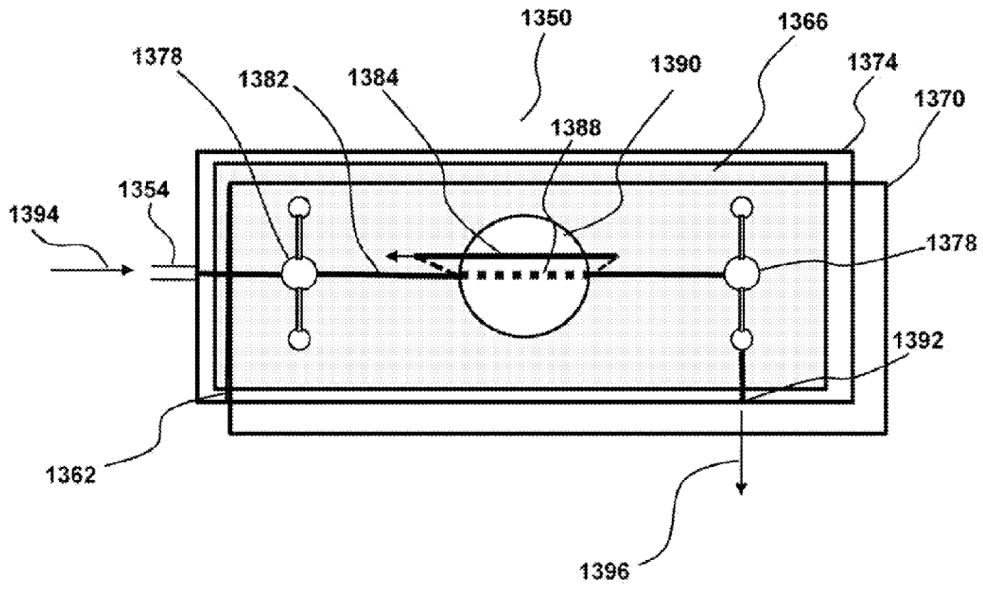
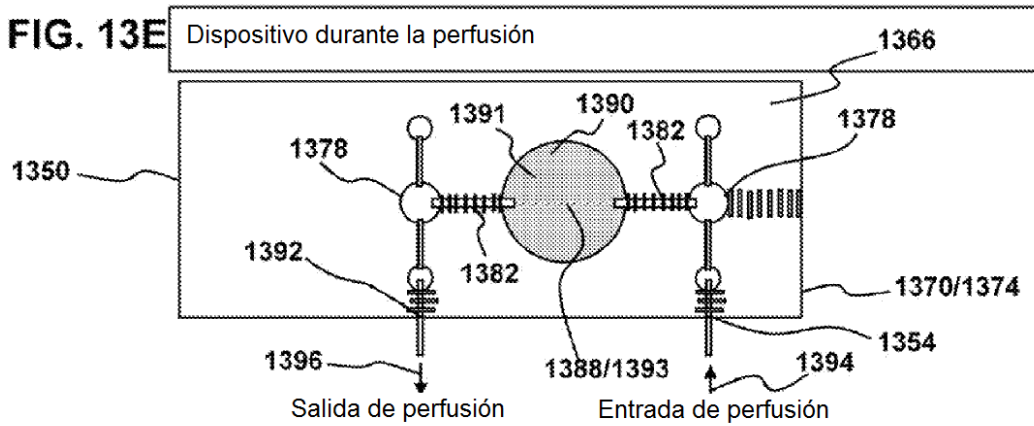
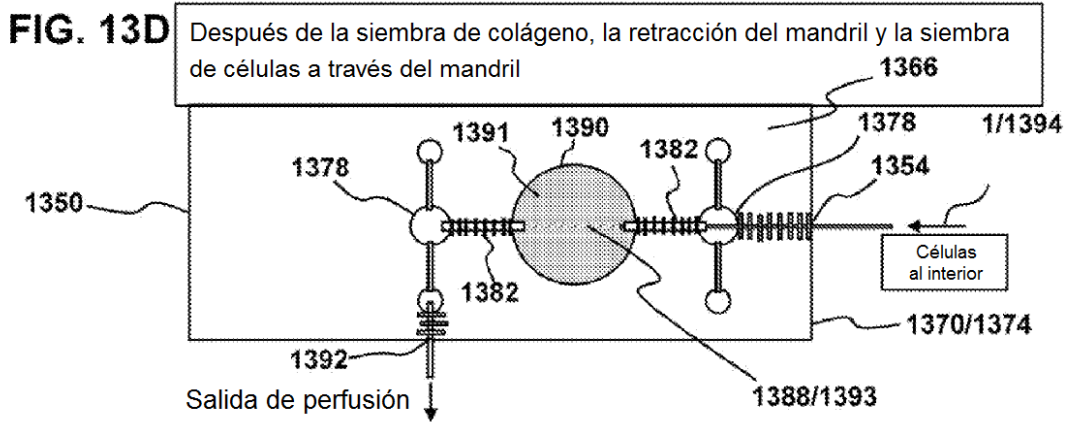
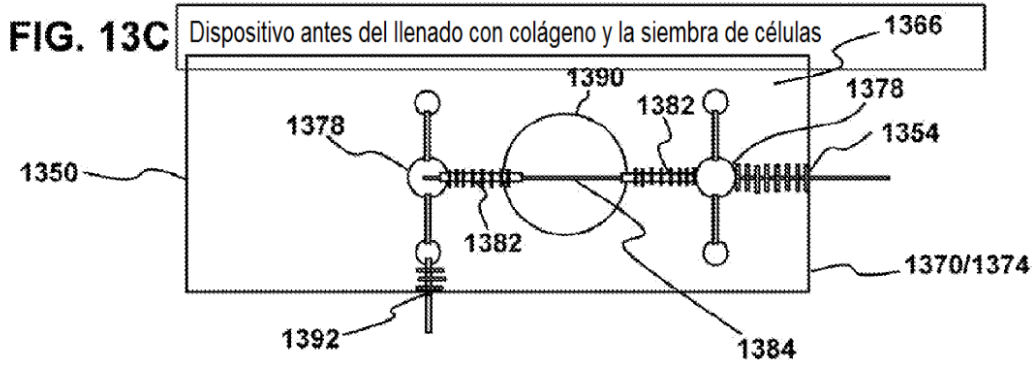
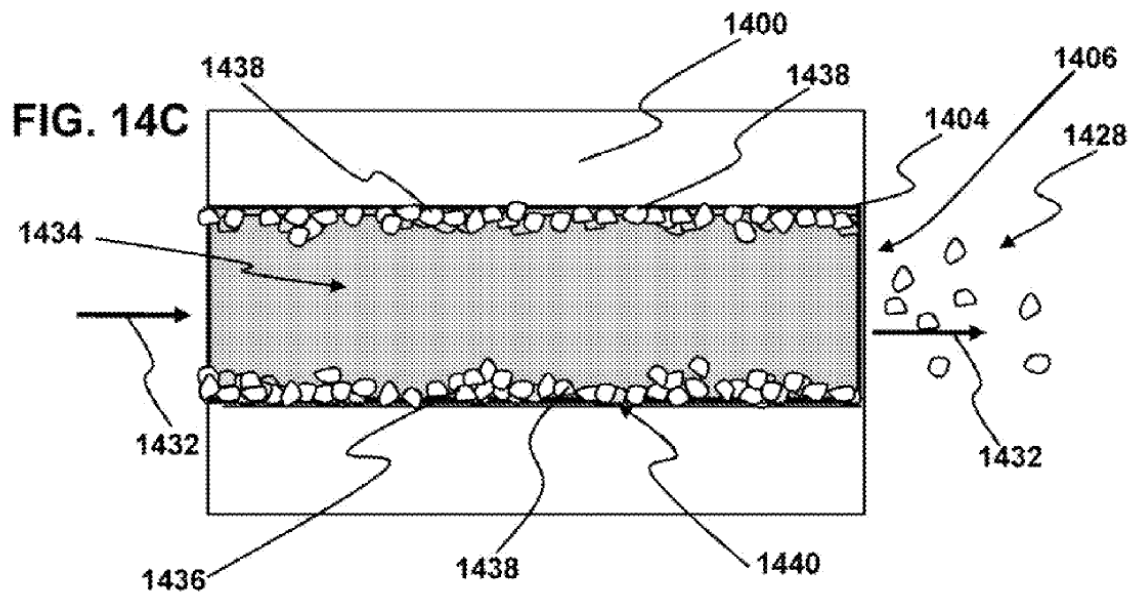
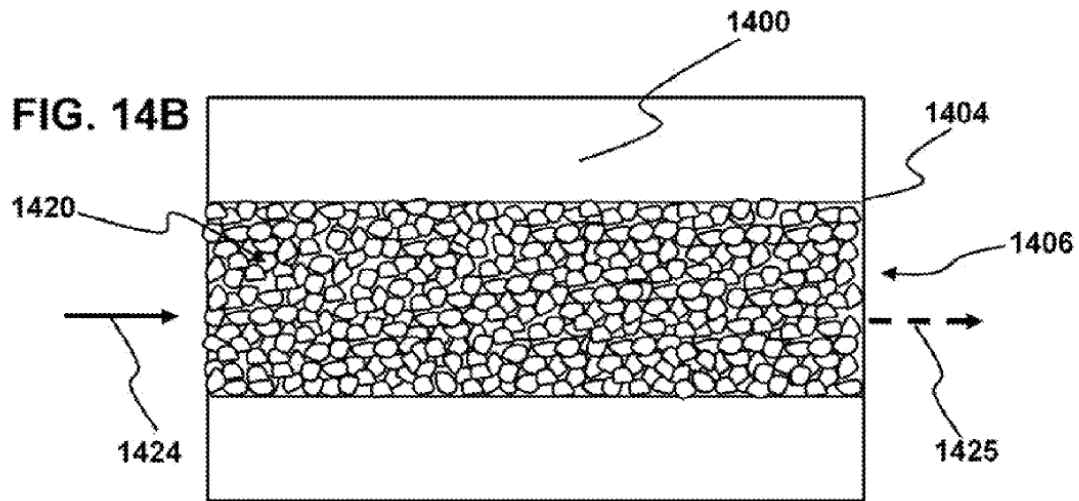
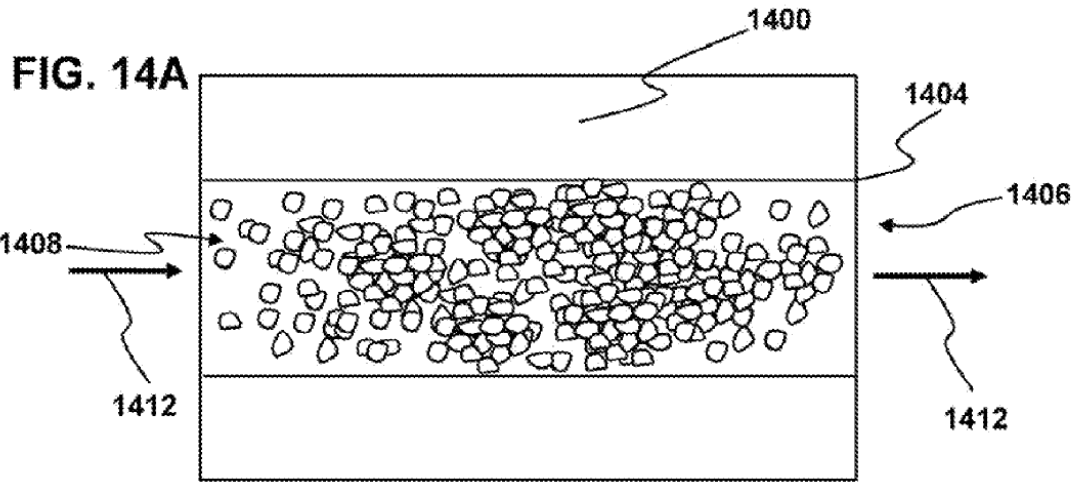


FIG. 13B







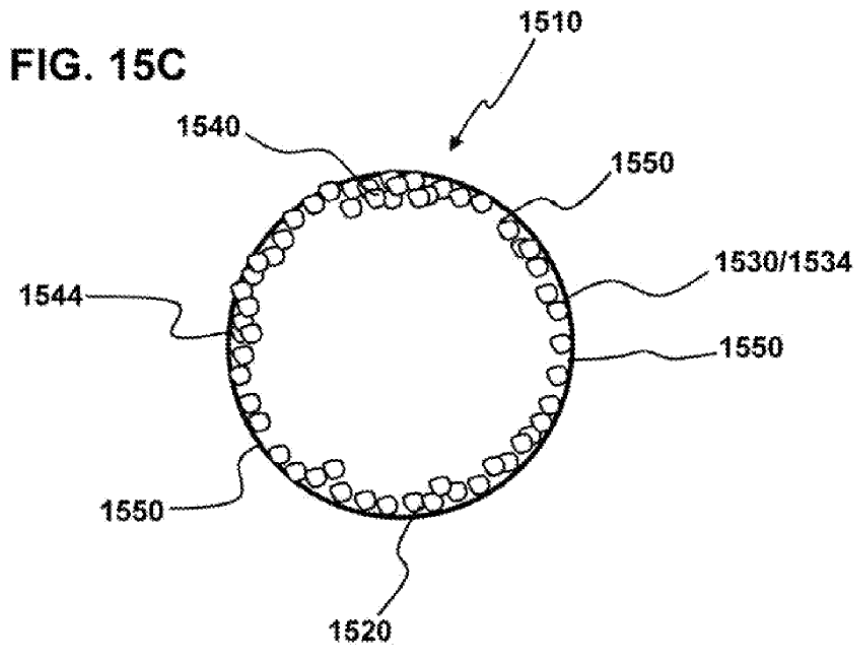
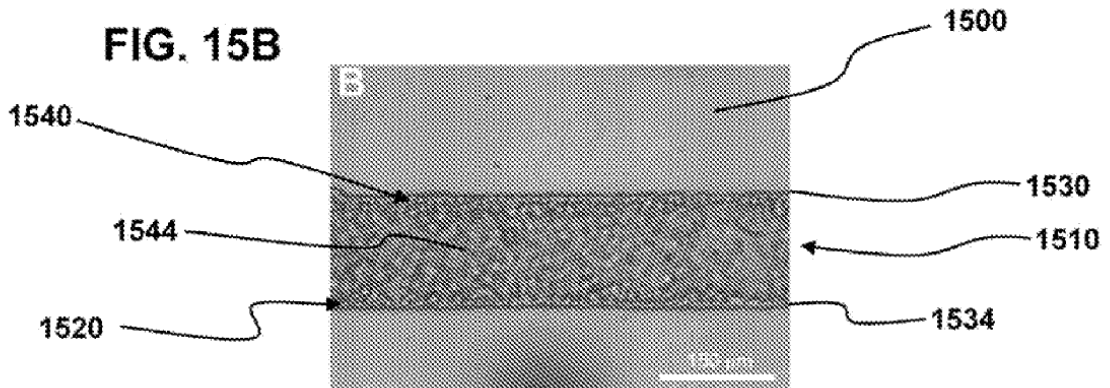
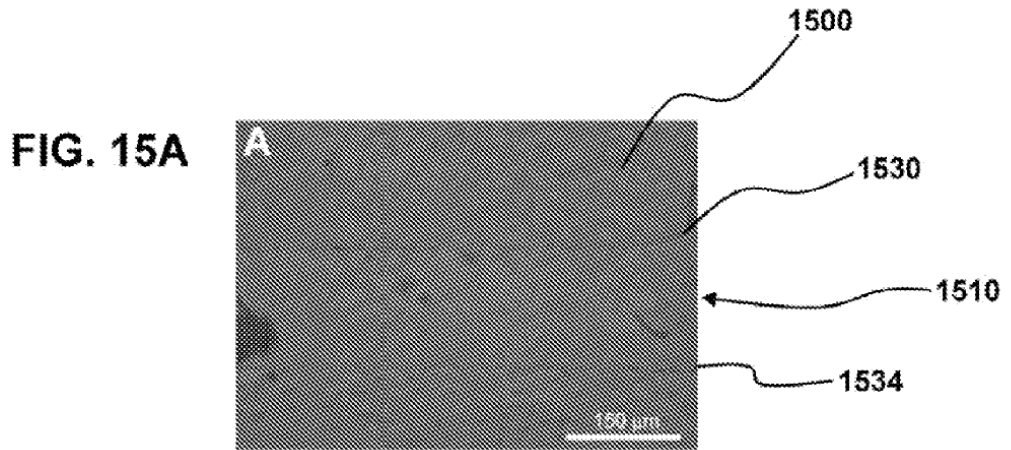


FIG. 16

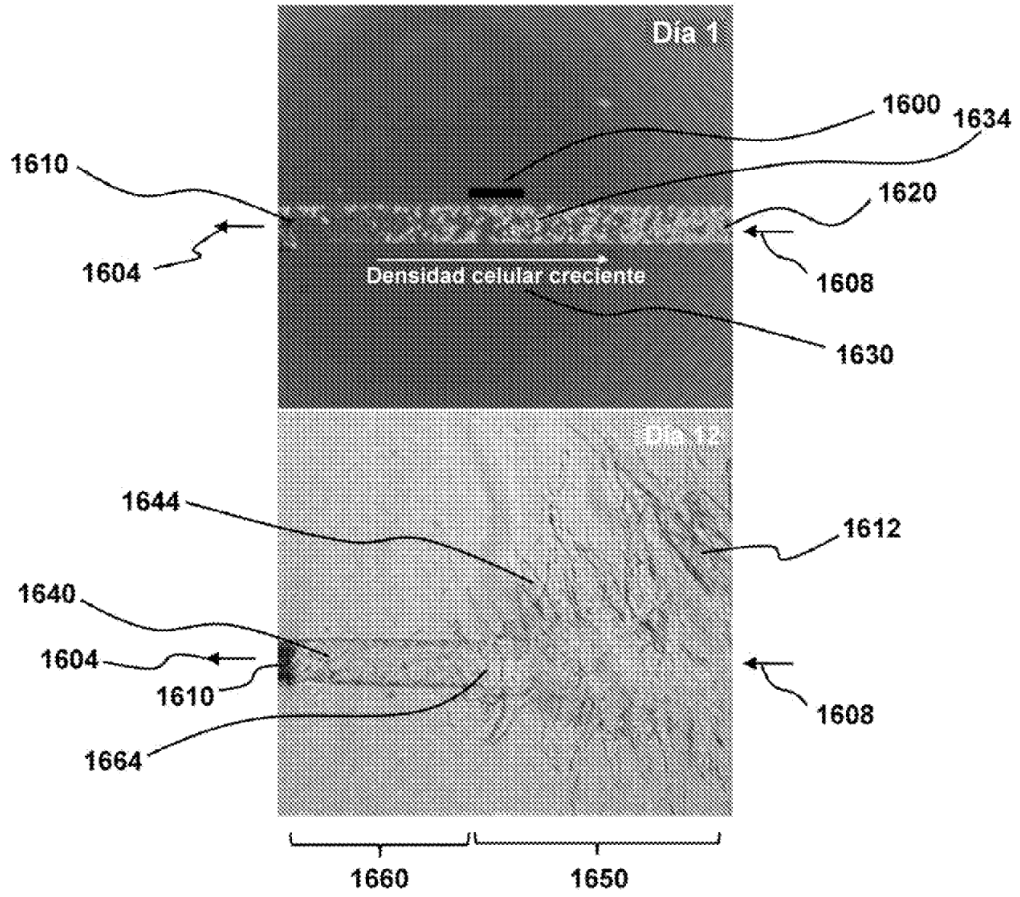


FIG. 17

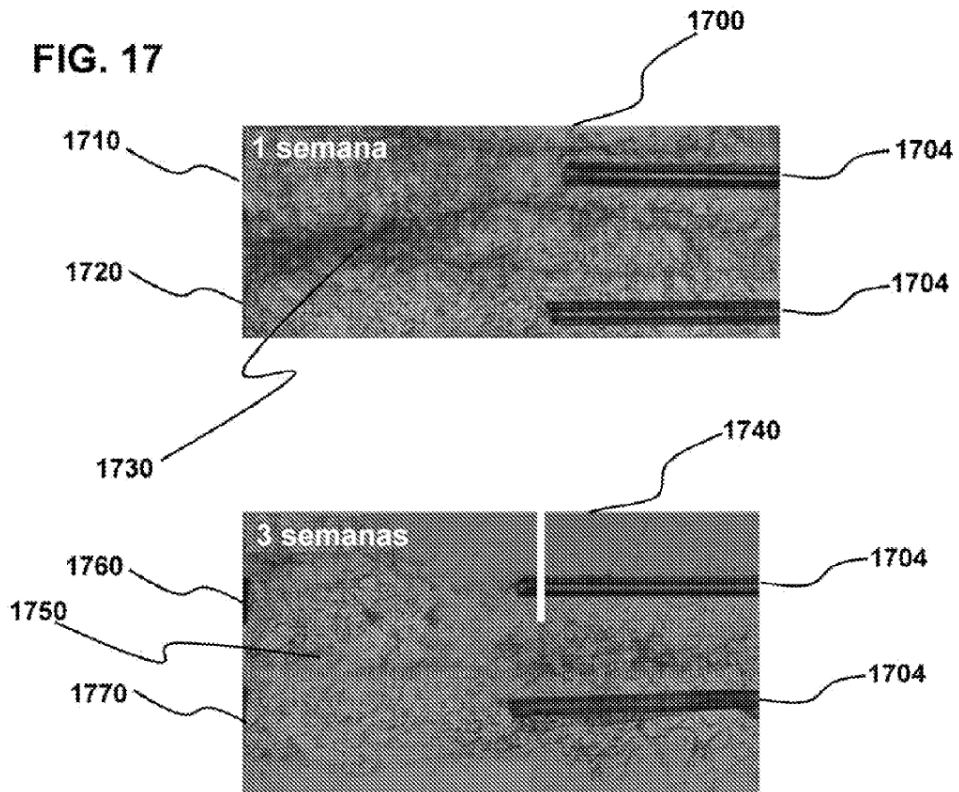
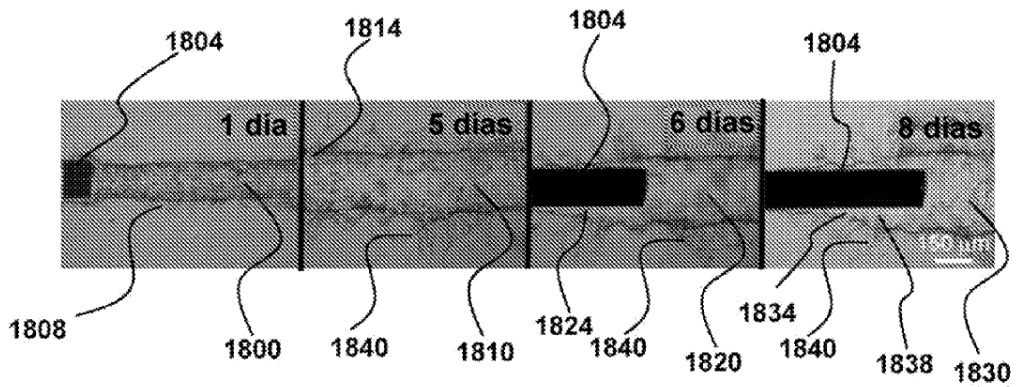
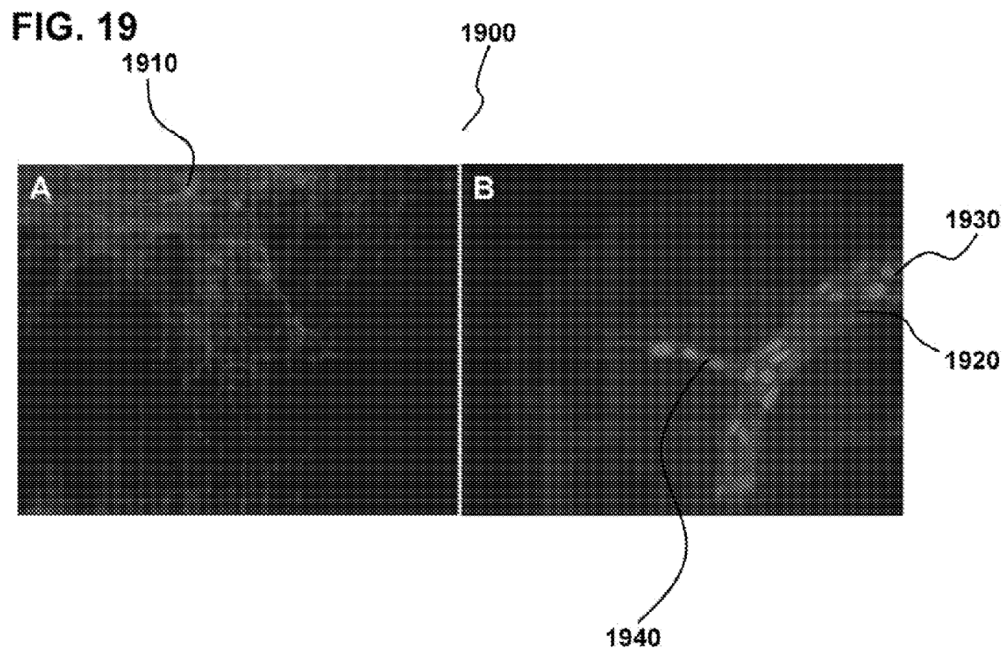
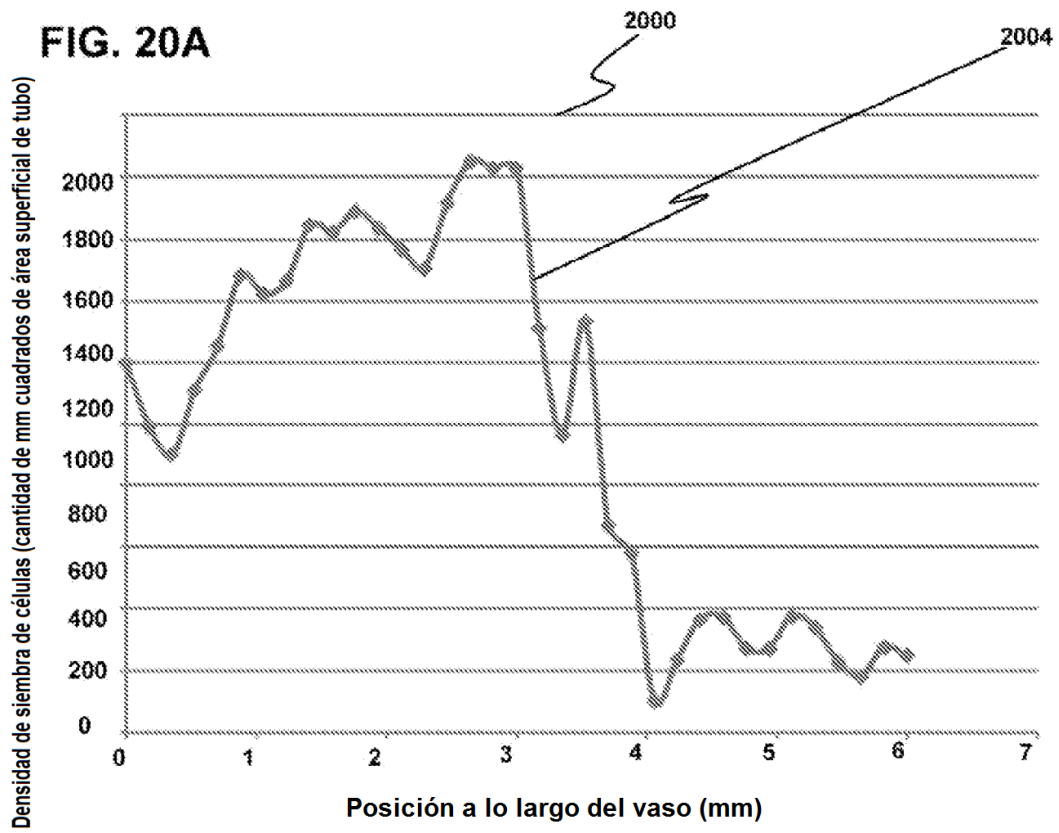


FIG. 18









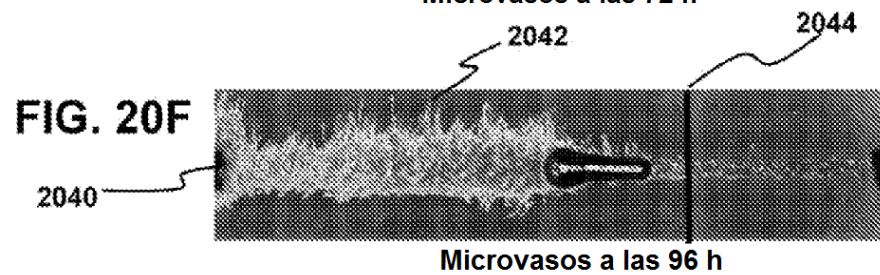
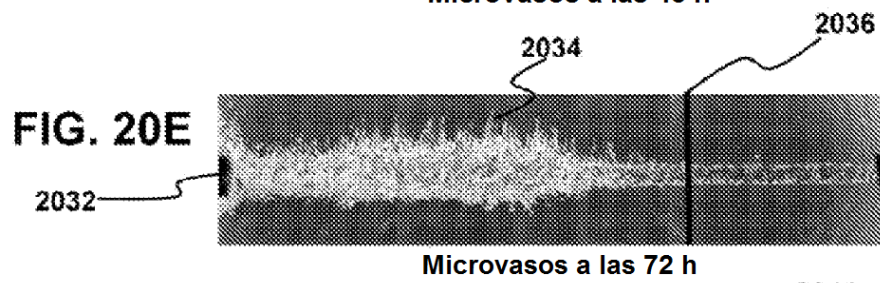
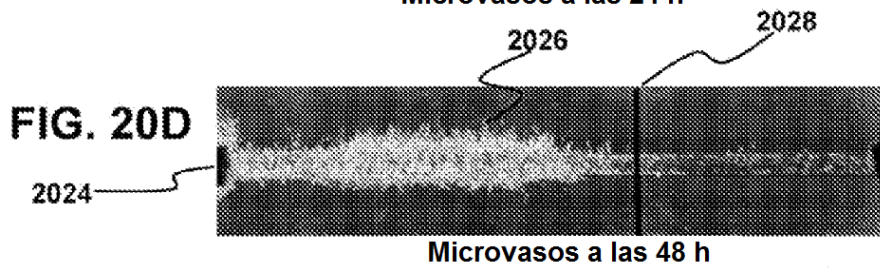
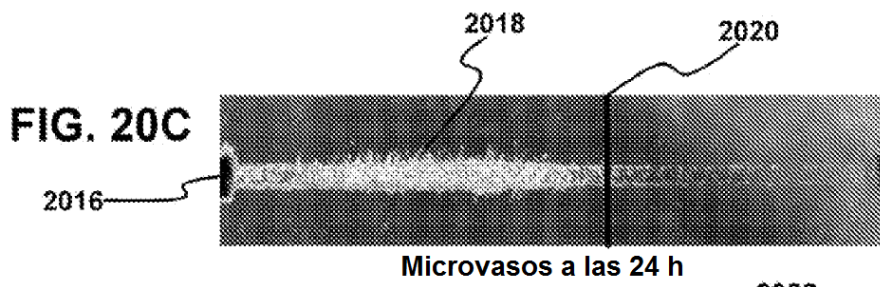
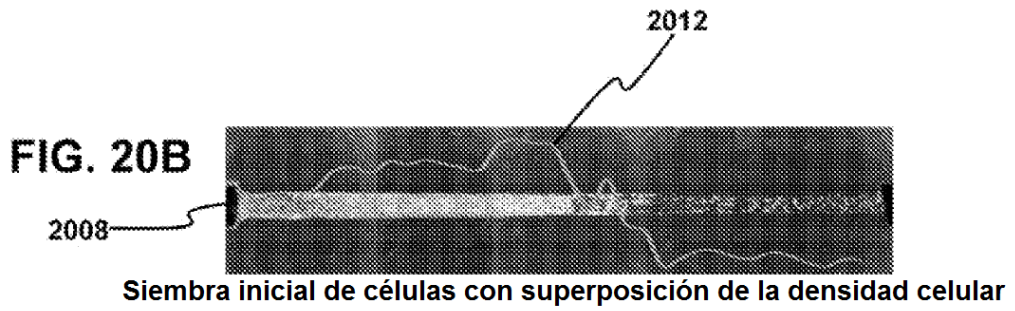


FIG. 21A

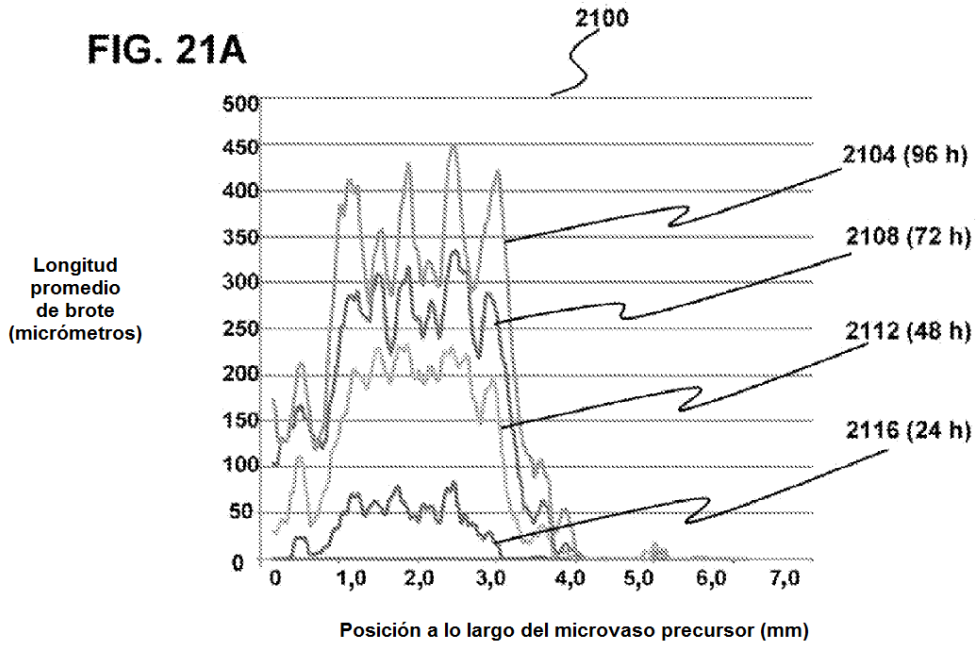


FIG. 21B

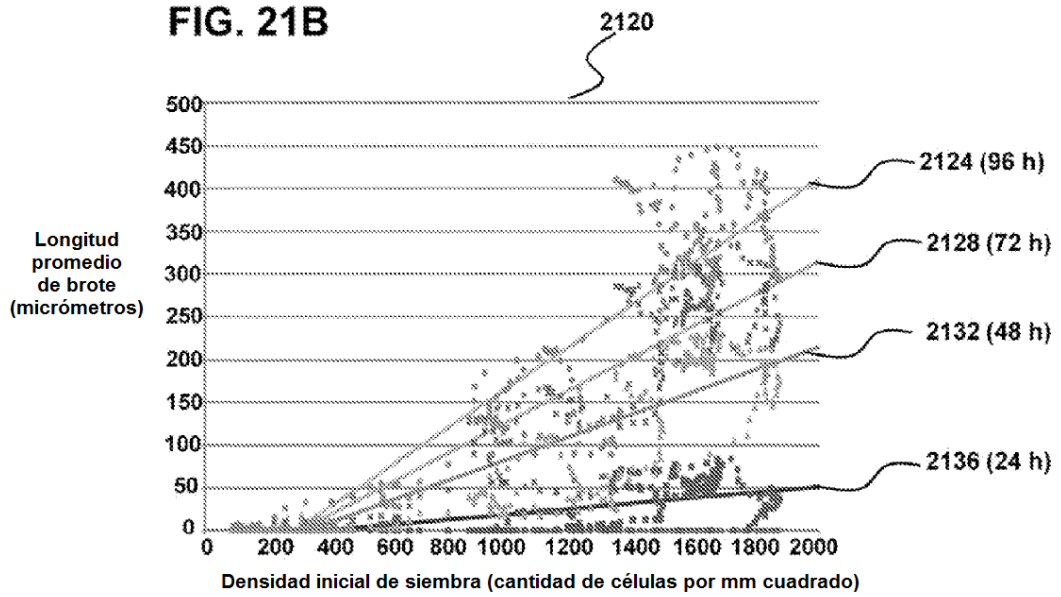


FIG. 22

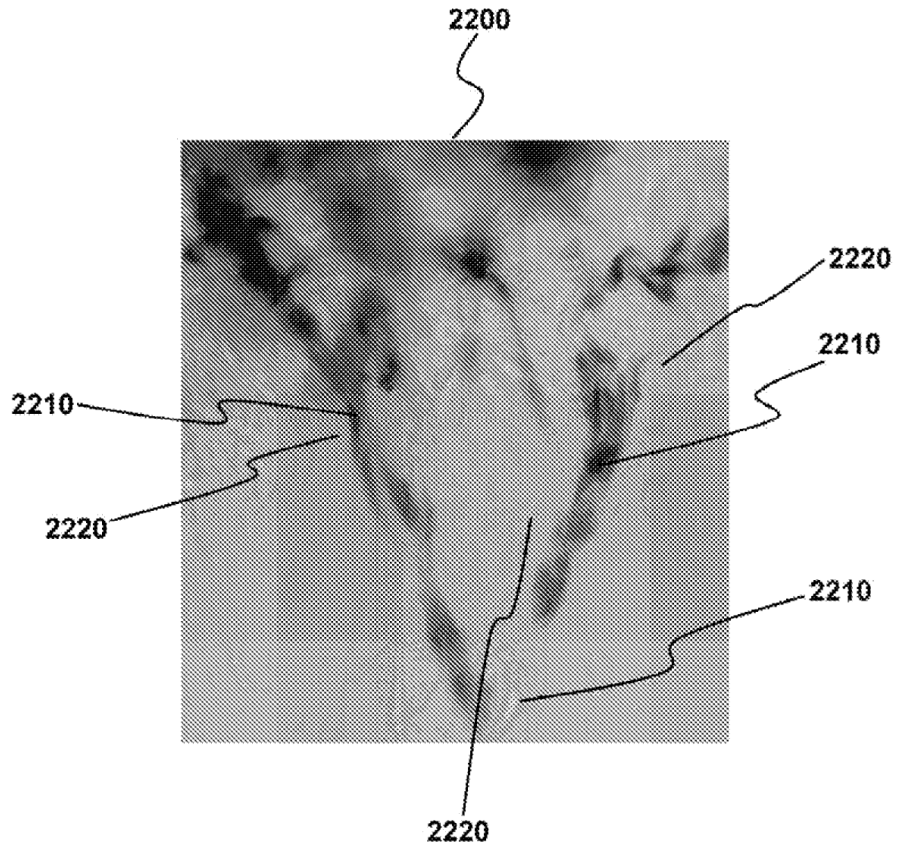


FIG. 23

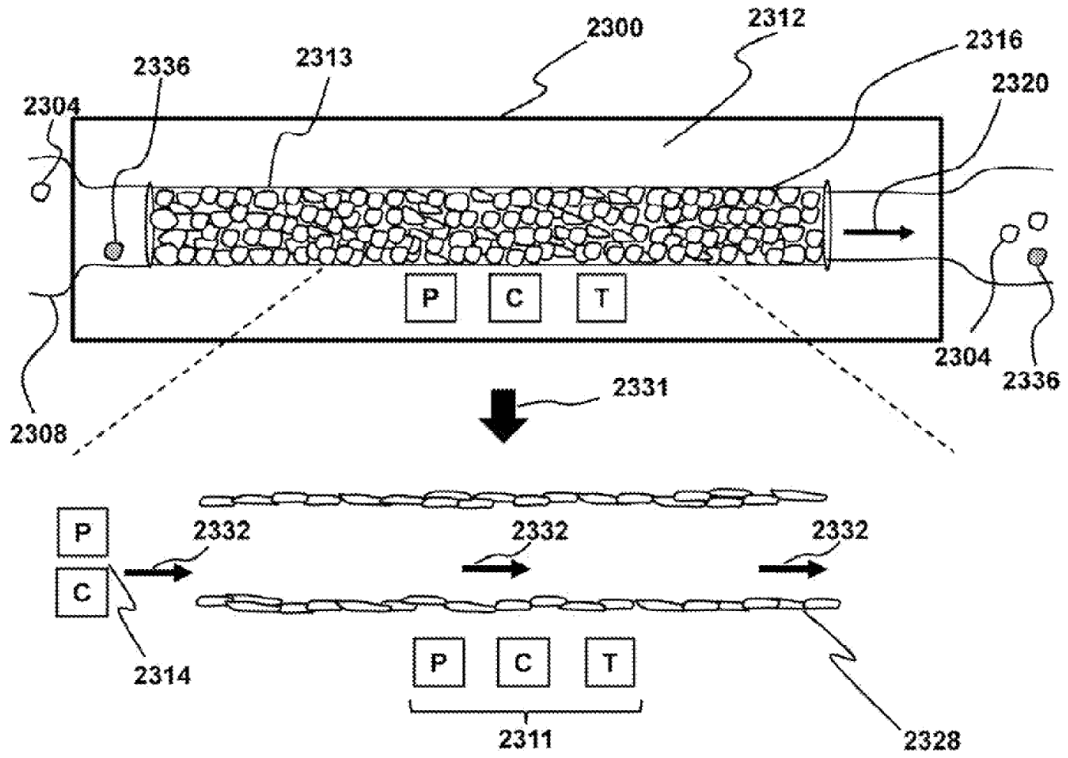


FIG. 24A

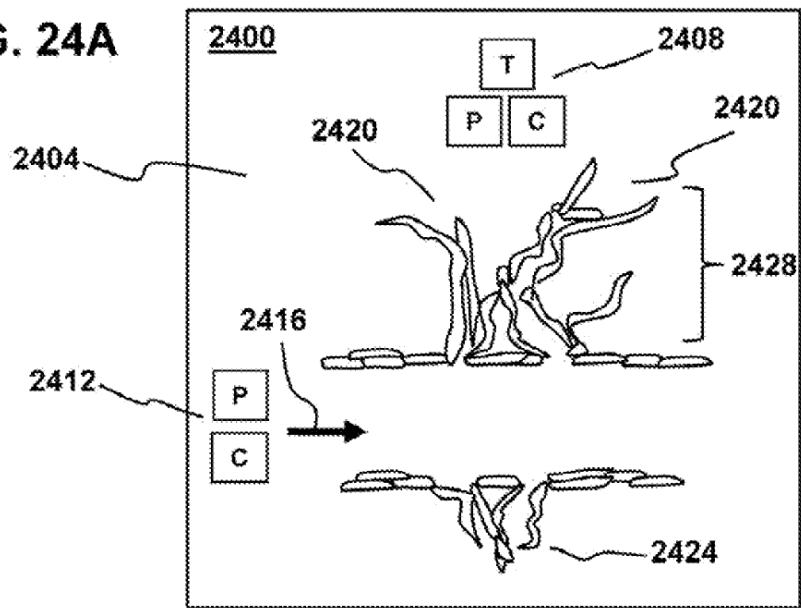


FIG. 24B

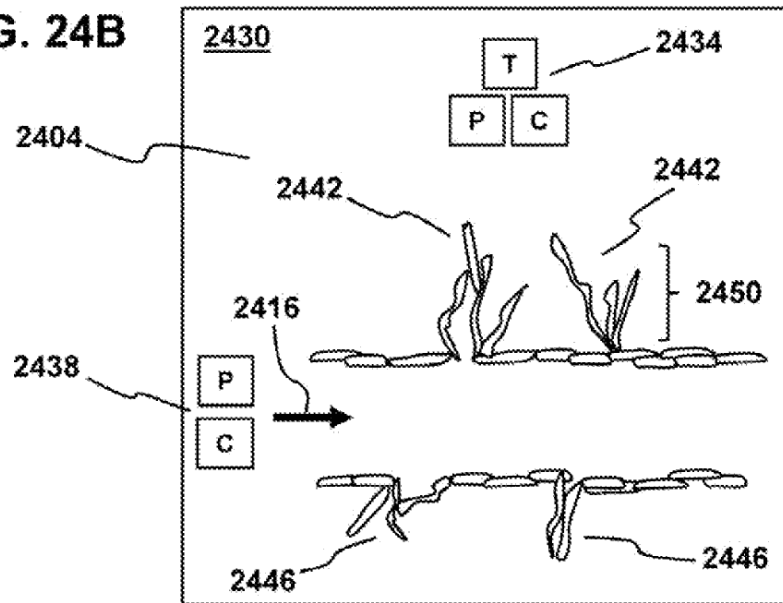


FIG. 25A

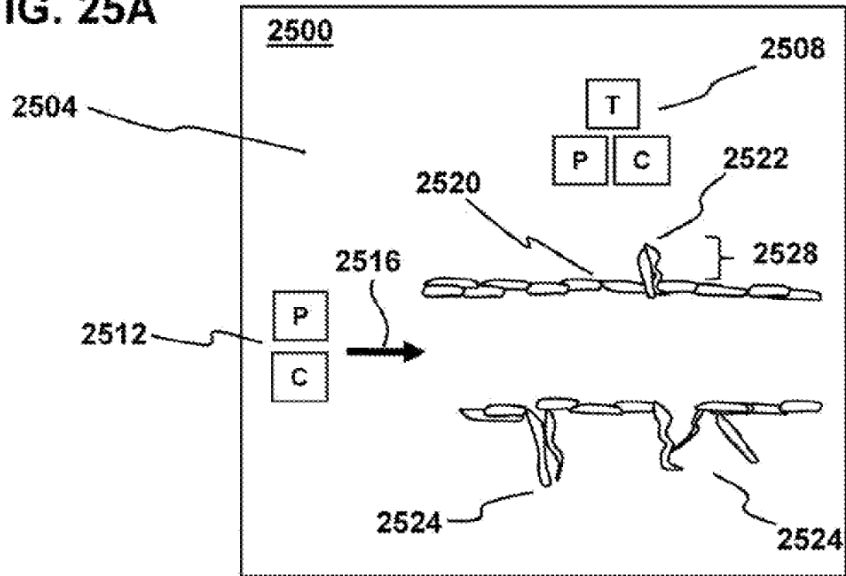


FIG. 25B

