

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 672 525**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/071** (2010.01)

**C12N 5/0775** (2010.01)

**C12N 5/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.06.2009 PCT/NL2009/050368**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.12.2009 WO09154466**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.06.2009 E 09766884 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.03.2018 EP 2310491**

54 Título: **Módulos de tejido auto-ensamblables**

30 Prioridad:

**20.06.2008 EP 08158652**

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

**14.06.2018**

73 Titular/es:

**UNIVERSITEIT MAASTRICHT (100.0%)  
Minderbroedersberg 4-6  
6211 LK Maastricht, NL**

72 Inventor/es:

**RIVRON, NICOLAS CLÉMENT;  
ROUWKEMA, JEROEN;  
TRUCKENMULLER, ROMAN;  
LE GAC, SÉVERINE;  
VAN BLITTERSWIJK, CLEMENS ANTONI y  
VRIJ, ERIK JACOB**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 672 525 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

## Módulos de tejido auto-ensamblables

La divulgación se refiere a un nuevo enfoque para construir agregados celulares de tamaños y formas definidos *in vitro* y a su uso en métodos para producir construcciones de tejidos tridimensionales de una manera modular.

- 5 La mayoría de los tejidos consisten en múltiples tipos de células organizadas con heterogeneidad a microescala específica. Típicamente, un centímetro cúbico puede contener hasta 300 millones de células. Estas células forman diferentes estructuras dentro del tejido, incluidos los capilares sanguíneos y una red neuronal, que son cruciales para la nutrición, la inervación y la homeostasis del tejido. Las células se organizan e interactúan en una multitud de arquitecturas y sintetizan una diversidad de moléculas biológicamente activas para el soporte mecánico y la
- 10 instrucción celular. Por lo tanto, los tejidos vivos son muy complejos.

La ingeniería tisular es un término utilizado para intentar producir tejido vivo *in vitro* a partir de células individuales o grupos de células. Su objetivo es reparar o reemplazar partes o tejidos completos y proporciona soluciones a la escasez de donación de órganos o al uso de animales de experimentación para probar nuevas terapias.

- 15 Debido a la alta complejidad del tejido vivo, los esfuerzos para producir o imitar tejidos vivos *in vitro* han sido en vano hasta la fecha y se necesitan nuevos métodos y tecnologías para ensamblar células en estructuras tisulares. Esta es actualmente una limitación principal en disciplinas tales como medicina regenerativa, farmacología, oncología y biología del desarrollo, en las que el cultivo en 2D y los agregados de células tridimensionales en bruto (véase, *p. ej.*, el documento WO-A-00/75286) todavía son estándares. Como resultado, experimentos biológicos *in vitro* ni siquiera se acercan a la realidad biológica compleja, el progreso de la investigación está seriamente inhibido y los animales
- 20 experimentales deben ser utilizados como una alternativa experimental insatisfactoria.

Con los desarrollos recientes tanto en biología de células madre adultas como embrionarias, es cada vez más factible inducir a las células en cultivo a más y más tipos de células individuales que se encuentran en el cuerpo humano y en números altos espectaculares.

- 25 Desafortunadamente, todavía no se ha desarrollado una tecnología satisfactoria para pasar de una agrupación grande de células que incluye diferentes tipos de células a un mimético de tejidos con una arquitectura compleja. Se están explorando actualmente varias estrategias posibles tales como la impresión de órganos (véase, *p. ej.*, el documento WO-A-2005/081971) y la tecnología de láminas celulares. Estas estrategias dependen en gran medida de la posibilidad de posicionar (agrupaciones de) células en una organización predefinida. Estas estrategias encuentran obstáculos que impiden la traducción de una arquitectura compleja a un tejido de escala de centímetro
- 30 real (es decir, remodelación de la construcción de tejido a lo largo del tiempo debido a la contracción física o la migración celular). Además, el razonamiento en el que se basa la impresión de órganos sigue estando fuera del alcance de la ciencia contemporánea, ya que simplemente requiere demasiados ( $10^8$ ) pasos individuales. Incluso a una velocidad, actualmente inalcanzable, de depositar mil células individuales por segundo en la ubicación tridimensional correcta, con precisión micrométrica, supondría cerca de cuatro días construir un solo centímetro cúbico de tejido. Estos enfoques y tecnologías relacionados dan como resultado una construcción multicelular
- 35 metaestable: la construcción no es estable, sino que se remodelará de acuerdo con principios biológicos complejos. Esto significa que con estas estrategias, una estructura diseñada y complejidad no se traduce al tejido objetivo. Fomentar el auto-ensamblaje y la auto-organización de agrupaciones de células es, por lo tanto, un enfoque más poderoso. En este enfoque, las células se ensamblan en una construcción propensa a un tiempo extra de remodelación predecible. Bajo condiciones marco apropiadas, la construcción conduce a un tejido final
- 40 organizado. Esto se consigue utilizando un enfoque ascendente para ensamblar secuencialmente células en, subsiguientemente, agregados supracelulares y tejidos y fomentando la auto-organización del tejido utilizando condiciones marco.

- 45 Ya se han descrito varios intentos de ensamblar células en tejidos utilizando un enfoque ascendente que son diferentes del método presentado. McGuigan y Sefton (*PNAS* 2006, 103(31), 11461-11466) han intentado superar estas dificultades prácticas partiendo de componentes modulares a microescala, que consisten en varillas de gel de colágeno de tamaño submilimétrico sembradas con células endoteliales en un tejido microvascularizado. Estos módulos se ensamblaron manualmente en un tubo más grande y se perfundieron por medio o sangre. Sin embargo, su enfoque requiere el uso de un gel, en este caso un gel de colágeno, para obtener los módulos y conservar su
- 50 integridad estructural durante el posterior ensamblaje manual en estructuras más grandes. Aunque el uso de un gel puede ser ventajoso en algunos casos para controlar, por ejemplo, la densidad celular, el atrapamiento de células dentro de un gel disminuirá la plasticidad de los módulos y evitará la fusión entre los módulos. La eliminación de la necesidad de utilizar geles para la formación de módulos de tejido permite una mayor plasticidad y remodelación fisiológica del tejido durante el proceso de auto-ensamblaje. Sodunke *et al.* (*Biomaterials* 2007, 28(27), 4006-4016) describen un enfoque similar basado en un hidrogel de biomatriz. Los geles tienen las desventajas de que la interfaz
- 55 no está disponible y de que las células tienen poca movilidad.

Un intento temprano para generar agregados celulares exentos de gel para uso como bloques de construcción para construir tejidos mayores ha sido descrito por Kelm *et al.* (*Tissue Eng.* 2006, 12(9), 2541-2553). Este intento se basa en el método denominado "gota colgante", en el que las células en una gota invertida de medio de cultivo tisular precipitan y se agregan. Sin embargo, este método no puede generar cantidades suficientemente grandes de agregados celulares en un tiempo suficientemente corto. Métodos convencionales para producir modelos multicelulares (tales como el método de la gota colgante o el cultivo de micromasa) adolecen de un cierto número de limitaciones que incluyen (i) un control deficiente del tamaño y la forma de los agregados, y reproducibilidad, (ii) manipulaciones tediosas y que requieren mucho tiempo. (iii) bajo rendimiento de producción de microtejidos. Napolitano *et al.* (*Tissue engineering* 2007, 13(8), 2087-2095) describen un método para formar agregados celulares mediante autoensamblaje en hidrogeles no adhesivos micromoldeados. Este documento no describe la formación de agregados celulares precondensados en un primer paso y el posterior auto-ensamblaje de los agregados celulares como bloques de construcción en un segundo paso. Por lo tanto, este método induce una remodelación intensa y no predecible (*p. ej.*, una contracción) de la construcción del tejido.

La invención tiene como objetivo superar uno o más de estos problemas produciendo agregados supracelulares de células de cualquier tipo de célula utilizando un confinamiento espacial. Estos agregados se utilizan como bloques de construcción y se combinan utilizando condiciones marco que fomentan su auto-ensamblaje y auto-organización para crear arquitecturas multicelulares complejas.

La divulgación proporciona un método para producir *in vitro* una construcción de tejido, que comprende:

- a) combinar células vivas para formar agregados supracelulares utilizando confinamiento espacial;
- b) combinar dos o más de los agregados supracelulares en un molde o en un biomaterial;
- c) aplicar condiciones que inducen el auto-ensamblaje dentro de los agregados supracelulares combinados para obtener la construcción de tejido; y
- d) aplicar condiciones que inducen la morfogénesis tisular en la construcción de tejido.

La divulgación proporciona también diversas ventajas sobre los métodos de la técnica anterior, incluyendo el uso de herramientas simples que pueden manejarse en la mayoría de los laboratorios de biología, la capacidad de generar una gran cantidad de agregados en un procedimiento rápido y simple (*p. ej.*, 220.000 agregados por placa convencional de 12 pocillos), y la ausencia de un hidrogel como material de soporte.

El confinamiento espacial se puede lograr de varias maneras. Una forma bien conocida y frecuentemente empleada es mediante el uso de matrices de micropocillos. Otras formas de imponer el confinamiento espacial incluyen el uso de interfaces aire-líquido como el método de la gota colgante o canales de microfluidos. Cualquier material procesable biocompatible puede utilizarse para el confinamiento espacial empleado para el ensamblaje de las células en agregados supracelulares.

El término "micropocillo", tal como se utiliza en esta solicitud, se refiere a una matriz de numerosas estructuras tipo copa formadas en una capa de material sustancialmente uniforme mediante diseño fotolitográfico, moldeo, estampado u otros procesos de fabricación. Cada uno de los micropocillos incluye así una pared inferior (que puede estar formada por un sustrato sobre el que se deposita el material del micropocillo) y una o más paredes laterales periféricas (*p. ej.*, una pared circular única o tres o más paredes contiguas sustancialmente rectas) que se extienden hacia arriba desde la pared inferior y rodean un área de pared inferior predefinida, definiendo los bordes superiores de las paredes laterales periféricas un extremo abierto del micropocillo. Típicamente, pueden utilizarse micropocillos que tienen un diámetro envolvente de 50-500  $\mu\text{m}$ . La profundidad de los micropocillos está normalmente en el intervalo de 100-1000  $\mu\text{m}$ . Para la siembra es ventajoso que los micropocillos individuales estén cerca uno del otro con el fin de evitar que las células permanezcan en los espacios entre los micropocillos. Por lo tanto, la distancia máxima entre dos micropocillos vecinos individuales en la matriz puede ser, por ejemplo, de 300  $\mu\text{m}$  o menos, preferiblemente de 200  $\mu\text{m}$  o menos, más preferiblemente de 100  $\mu\text{m}$  o menos, tal como aproximadamente 50  $\mu\text{m}$ . El número de micropocillos en la matriz puede variar en función del tamaño de los micropocillos y la distancia entre micropocillos individuales. Una matriz puede tener 50-20.000 pocillos tal como 50-5000 o 100-2000 pocillos.

El término "auto-ensamblaje", tal como se utiliza en esta solicitud, quiere dar a entender la creación de unidades de tejido (o unidades de construcción pequeñas) mediante asociación de células individuales o agregados celulares. Las células individuales o los agregados celulares se adhieren entre sí en disposiciones específicas para dar superestructuras unidimensionales, bidimensionales o tridimensionales. La agregación puede ser espontánea sin intervención humana, o puede ser como resultado de condiciones del entorno locales cambiantes, *p. ej.*, temperatura, concentración de células, límites físicos (tales como la forma o dimensión específica de los micropocillos y/o del molde), *etc.*

En un primer paso, un método según se describe en esta memoria comprende producir un agregado supracelular de células. Estas células pueden ser del mismo tipo ("homocelulares") o de un tipo diferente ("heterocelulares") dentro de un agregado. Sin embargo, se prefiere que un agregado esté formado por células de un tipo de célula. La diversificación de la construcción de tejido que se ha de producir se puede lograr combinando agregados de diferentes tipos de células.

Se pueden utilizar muchos tipos de células para formar los agregados celulares. En general, la elección del tipo de celda variará dependiendo del tipo de construcción tridimensional a construir. Por ejemplo, para una estructura tridimensional de tipo de vaso sanguíneo, los agregados celulares comprenderán ventajosamente un tipo o tipos de células que típicamente se encuentran en tejido vascular (*p. ej.*, células endoteliales, células de músculo liso, *etc.*). Por el contrario, la composición de los agregados celulares puede variar si se ha de producir un tipo diferente de construcción (*p. ej.*, intestino, hígado, riñón, *etc.*). Un experto en la técnica será así fácilmente capaz de elegir un tipo de célula apropiado para los agregados, basado en el tipo objetivo de construcción tridimensional. Ejemplos no limitantes de tipos de células adecuados incluyen células contráctiles o musculares (*p. ej.*, células musculares estriadas y células de músculo liso), células neurales, tejido conjuntivo (incluidos huesos, cartílagos, osteoblastos, osteoclastos, células que se diferencian en células formadoras de hueso y condrocitos, y tejidos linfáticos), hepatocitos, cardiomiocitos, miocitos, células de Schwann, células uroteliales, células parenquimatosas, células epiteliales (incluidas células endoteliales que forman revestimientos en cavidades y vasos o canales, células epiteliales secretoras exocrinas, células epiteliales absorbentes, células epiteliales queratinizantes y células de secreción de la matriz extracelular) y células no diferenciadas (tales como células embrionarias, células progenitoras, células madre (mesenquimales), células de la médula ósea, células satélite, fibroblastos y otras células precursoras), entre otros. También se pueden utilizar de forma adecuada células vegetales y algas.

Los agregados pueden variar tanto en tamaño como en forma. Por ejemplo, pueden tener la forma de una esfera, un cilindro (preferiblemente con igual altura y diámetro), una varilla, un cubo o similar. Aunque se pueden utilizar otros agregados conformados, generalmente es preferible que los agregados celulares sean esféricos, cilíndricos (con igual altura y diámetro), o cuboidales (*es decir*, cubos), ya que los agregados de estas formas pueden ser más fáciles de manipular. La forma de los agregados celulares puede jugar un papel importante en la promoción del auto-ensamblaje. Las diferentes formas de agregados pueden generar diferentes disposiciones por apilamiento. Las formas de los agregados celulares pueden, por ejemplo, fomentar una estrecha proximidad entre los agregados celulares (*p. ej.*, el sistema de cerradura con llave) o crear espacio libre en sus interfaces. Los agregados son de un tamaño sustancialmente uniforme y de una forma sustancialmente uniforme cuando se combinan, pero se pueden ensamblar diferentes formas y tamaños para generar diferentes estructuras heterogéneas.

Aunque el número exacto de células por agregado no es crítico, los expertos en la técnica reconocerán que el tamaño de cada uno de los agregados (y, por lo tanto, el número de células por agregado) está limitado por la capacidad de los nutrientes para difundirse a las células centrales, y que este número puede variar dependiendo del tipo de célula. Los agregados celulares pueden comprender un número mínimo de células (*p. ej.*, dos o tres células) por agregado, o pueden comprender muchos cientos o miles de células por agregado. Típicamente, los agregados celulares comprenden cientos a cientos de miles de células por agregado.

El número de células en un agregado puede controlarse mediante el confinamiento espacial aplicado. Por ejemplo, el número de células en un agregado puede depender del número de células que se siembran en un micropocillo y del tamaño del pocillo. Sin embargo, no existe una relación 1:1, ya que la muerte y la proliferación celular pueden ocurrir durante la formación del agregado. En un método adecuado, el número de células que se proporciona por micropocillo es de 2-500.000, tal como 100-100.000 o 100-50.000. Además, el número de células aplicadas, *p. ej.*, por micropocillo, también depende del tamaño del agregado deseado.

Para los fines de la presente invención, los agregados celulares son típicamente de aproximadamente 100 micras a aproximadamente 600 micras de tamaño, tal como de aproximadamente 200 a aproximadamente 400 micras, aunque el tamaño puede ser mayor o menor que este intervalo, dependiendo del tipo de célula. Tal como se describe en esta memoria, los agregados celulares son de aproximadamente 250 micras a aproximadamente 400 micras. Tal como se describe también en esta memoria, los agregados celulares tienen un tamaño de aproximadamente 250 micras. Por ejemplo, los agregados celulares esféricos son preferiblemente de aproximadamente 20 micras a aproximadamente 600 micras de diámetro (tal como de aproximadamente 100 micras a aproximadamente 600 micras), los agregados celulares cilíndricos son preferiblemente de aproximadamente 100 micras a aproximadamente 600 micras de diámetro y altura, y los lados de los agregados celulares cuboidales son preferiblemente de aproximadamente 100 micras a aproximadamente 600 micras de longitud. Los agregados de otras formas serán generalmente de un tamaño similar. El tamaño de los agregados puede medirse utilizando técnicas estándares de microscopía óptica.

El tamaño de los agregados celulares puede controlarse mediante el confinamiento espacial, tal como por el tamaño de los micropocillos, así como por el número de células que se utiliza, tal como el número de células sembradas en los micropocillos. Es importante destacar que el tamaño de los agregados depende más del número de celdas que

del diámetro envolvente del confinamiento espacial. El tamaño y/o la forma del confinamiento espacial se pueden ajustar aproximadamente para facilitar la formación adecuada de agregados. Si el confinamiento espacial es demasiado grande, las células no se encontrarán entre sí y no se agregarán. Si el confinamiento espacial es demasiado pequeño, entonces no todas las células caben en el pocillo. Por ejemplo, para agregados que tienen un tamaño entre 0 y 90  $\mu\text{m}$ , son adecuados los micropocillos circulares con un diámetro de 100 micras; para agregados que tienen un tamaño entre 90 y 150  $\mu\text{m}$ , son adecuados los micropocillos circulares con un diámetro de 200  $\mu\text{m}$ ; para agregados entre 150 y 350  $\mu\text{m}$  son adecuados micropocillos circulares con un diámetro de 400 micras.

Tal como se mencionó anteriormente, se producen agregados de células utilizando matrices de micropocillos que se pueden producir con tecnologías que incluyen, entre otras: pero no se limitan a tecnología de microchip, estampado en caliente, sinterización selectiva con láser, fabricación en forma libre de sólidos y micromoldeo con separación de fases. Con estas tecnologías pueden producirse matrices de micropocillos en láminas de diferentes materiales que incluyen, pero no se limitan a: PDMS (polidimetilsiloxano), colágeno, gelatina, hidrogeles y similares. Una ventaja importante de las tecnologías antes mencionadas es que pueden producir micropocillos con diferentes tamaños y formas.

La divulgación proporciona tanto el uso de confinamiento espacial con morfología única (tales como matrices que contienen morfología de micropocillos única) como el confinamiento espacial con dos o más morfologías (tales como matrices que contienen dos o más morfologías de micropocillos). Tal como se describe en esta memoria, los agregados celulares se forman aplicando una suspensión celular sobre la parte superior de la matriz de micropocillos. Típicamente, la concentración de células en la suspensión de siembra de células está en el intervalo de 500.000 células por ml a 5.000.000 de células por ml. Las células se depositan en los micropocillos de forma espontánea debido a fuerzas gravitatorias, o se fuerzan en los micropocillos utilizando, por ejemplo, fuerzas centrífugas, capilares o dispositivos microfluídicos.

Tras el confinamiento espacial, las células se agregarán espontáneamente mediante la adhesión entre las células. La adhesión entre los mismos tipos de células no es necesariamente mejor que entre diferentes tipos de células, aunque este puede ser el caso para algunos tipos de células específicas. La adhesión entre las diferentes células difiere de un tipo de célula a otro. Por ejemplo, las células madre mesenquimales humanas formarán esferoides que se condensarán mucho debido a la fuerte adhesión entre las células, HUVEC formará esferoides que difícilmente se condensarán debido a una adhesión moderada entre las células, y las células de ovario de hámster chino formarán placas en lugar de esferoides a baja adherencia entre las células. El ensamblaje de las células en agregados supracelulares puede ser asistido por diversas herramientas conocidas en la técnica, tales como herramientas de microfluidos, líquidos en movimiento, cámaras de confinamiento con propiedades modulares (superficies adherentes/no adherentes), utilizando superficies con topografías, o utilizando superficies con revestimientos.

Es importante observar en este aspecto que con el fin de que se formen agregados, la adhesión entre las células y el material circundante (tal como el material del micropocillo) es preferiblemente menor que la adhesión entre las propias células. Esto puede lograrse, por ejemplo, utilizando micropocillos de materiales que muestran baja adhesión celular, tales como PEG (polietilenglicol), PDMS o similares, o recubriendo la superficie de micropocillos con moléculas que evitan la adhesión celular tales como PEG y BSA (albúmina de suero bovino). Además, es importante observar que la formación de agregados depende de la adhesión celular del tipo de célula utilizado. Cuando un determinado tipo de célula es incapaz de formar agregados celulares espontáneamente, la agregación puede iniciarse utilizando compuestos tales como fibronectina o colágeno que pueden agregarse a la suspensión celular.

La forma de los agregados puede manipularse alterando la forma de confinamiento espacial. El tamaño de los agregados puede manipularse alterando el tamaño del confinamiento espacial, la concentración celular de la suspensión celular utilizada y/o la composición del medio de cultivo que se utiliza durante la agregación celular.

Una ventaja del uso de micropocillos en comparación con los métodos clásicos para producir agregados celulares, tal como el método de la gota colgante, es que en un solo 'paso' se pueden hacer miles de agregados al mismo tiempo, en lugar de simplemente un agregado. Esto permite la fabricación de grandes cantidades de agregados que se necesitan para este enfoque ascendente. Por ejemplo, en comparación con la agregación espontánea en una suspensión celular, los micropocillos permiten un control preciso y la reproducibilidad de la forma, el tamaño y las propiedades de superficie de los agregados.

La invención se ilustra adicionalmente en la Figura 1. El esquema de la parte superior describe los pasos técnicos para ensamblar células en tejidos con pasos geométricos en un enfoque ascendente. Las células se ensamblan en esferoides que se utilizan como bloques de construcción para construir tejidos. Estos tejidos están conformados, *p. ej.*, para fomentar la auto-remodelación y pueden ser influenciados para auto-organizarse. Por ejemplo, las puntas afiladas de un tejido triangular fomentan la compactación de la construcción, induciendo mecanismos de desarrollo adicionales. La imagen inferior muestra algunas de las herramientas que se pueden utilizar para poner en práctica el

método descrito. Sellos poliméricos se pueden utilizar para replicar estructuras en agarosa. Los chips de agarosa pueden insertarse en una placa de micropocillos convencional y utilizarse para el cultivo de células y tejidos.

La suspensión celular se puede añadir de forma adecuada a un recipiente (por ejemplo, una placa de 12 pocillos) en el que se ha colocado una matriz de micropocillos en el fondo. Las células pueden hundirse entonces en los pocillos mediante fuerzas gravitacionales o centrífugas. En principio, los valores de temperatura y pH no tienen que variar de los valores que se utilizan durante el cultivo estándar de los tipos de células respectivos. Sin embargo, hay aplicaciones previsibles en donde, por ejemplo, un cambio en la temperatura se puede utilizar para iniciar la agregación celular. La base para la suspensión celular es normalmente un medio de cultivo complementado con nutrientes estándares (no diferentes del cultivo celular normal). La agregación tiene lugar generalmente en una incubadora estándar (humidificada, 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>). Si se utilizan diferentes tipos de células, éstos se pueden mezclar en una suspensión celular o se pueden aplicar por separado, dependiendo de la situación inicial que se quiera crear. Si ambas células se mezclan en una suspensión celular, los diferentes tipos de células típicamente se mezclarán regularmente en el agregado resultante. Si los diferentes tipos de células se aplican en diferentes suspensiones celulares una tras otra, el agregado resultante consistirá típicamente en dos (o más) regiones distintas que contienen los dos (o más) tipos de células diferentes.

Una ventaja de los métodos tal como se describen en esta memoria es que pueden formarse agregados que no contienen nada más que células vivas. En particular, no es necesario el uso de un gel. De esta manera, pueden formarse agregados de una particular densidad celular alta. En algunos casos, esto puede conducir a un mejor contacto entre las diferentes células para el intercambio de compuestos, ya que algunas células dependen del contacto directo de las células para la comunicación celular. Además, la ausencia de un gel permite que las células produzcan mejor su propia matriz extracelular de forma fisiológica. Además, la adición de un gel de origen xenógeno puede imponer una complicación para aplicaciones clínicas. Al usar solo células autólogas, el producto es completamente propio del paciente.

El paso a) permite la condensación de las células en bloques de construcción (agregados supracelulares). Este proceso de condensación que se produce a lo largo del tiempo es esencial, ya que los microtejidos conformados no pueden producirse a una gran escala (mm) sembrando las células en pocillos grandes. La condensación de los pequeños agregados minimiza la condensación de las formas más grandes en una fase posterior. Si se saltara el paso de formar los agregados supracelulares a través de condensación, entonces la forma de una superficie de siembra posterior (tal como macropocillos) no se traduciría en la construcción deseada. Después de la siembra, el tejido se condensará hacia un esferoide, independientemente de la forma de la superficie de siembra. Aparte de eso, los autores de la invención descubrieron que la pre-condensación (*es decir*, la formación de agregados supracelulares) permite sembrar un mayor número de células como agregados (*p. ej.*, esferoides), en comparación con la siembra de una suspensión celular. Por lo tanto, es necesario condensar primero las células en bloques de construcción densos (agregados supracelulares) que después de ello se pueden utilizar y ensamblar en construcciones más grandes.

A continuación, los agregados celulares se combinan para obtener construcciones de tejidos más grandes. Esto se puede describir como un proceso de dos etapas.

La primera etapa es el auto-ensamblaje de agregados celulares en una construcción de tejido más grande. Tal como se describe en esta memoria, los agregados se separan de una matriz de micropocillos mediante el barrido de un medio (cultivo) sobre la superficie del micropocillo. Otra posibilidad es invertir un chip con micropocillos en la superficie para sembrar. Los agregados son luego liberados por fuerzas gravitatorias o centrífugas y son transferidos a la superficie de siembra (*p. ej.*, biomaterial, armazón, macro-pocillo). Para el auto-ensamblaje, los agregados pueden, por ejemplo, transferirse a pocillos que tienen un diámetro envolvente de al menos 500 µm. Cualquier material procesable biocompatible se puede utilizar para el confinamiento espacial aplicado para ensamblar los agregados supracelulares en construcciones de tejido.

El auto-ensamblaje de los agregados celulares se regirá por las "condiciones marco" impuestas de los agregados celulares tales como el tamaño del agregado supracelular, la forma del agregado supracelular, las propiedades superficiales del agregado supracelular (por ejemplo hidrofiliicidad/hidrofobicidad o un recubrimiento con moléculas bioactivas que da como resultado interacciones entre los agregados celulares), carga eléctrica agregada supracelular, carga magnética agregada supracelular y de "condiciones límite" de la cámara utilizada para ensamblar los agregados celulares tales como superficies adherentes o no adherentes de la cámara, topografías de la superficie de la cámara, deposición de proteínas y patrones en la superficie de la cámara y el uso de microfluidos para fomentar la disposición y el ensamblaje de los agregados celulares.

Preferiblemente, las "condiciones marco" se imponen a los agregados antes de que éstos se liberen del confinamiento espacial inicial. Dependiendo del tipo de condición marco, esto puede requerir o no un paso activo extra. Por ejemplo, la condición marco "tamaño de agregado supracelular" ya está impuesta por el confinamiento

espacial y la densidad de siembra. La condición marco "propiedades superficiales del agregado supracelular" se puede ajustar, por ejemplo, recubriendo los agregados antes de liberarlos del confinamiento espacial. La condición marco "carga magnética del agregado supracelular" puede imponerse durante la siembra (*p. ej.*, incluyendo partículas magnéticas) o recubriendo los agregados antes de liberarlos del confinamiento espacial.

5 Después de incorporar estas condiciones marco a los agregados celulares o la cámara utilizada para su auto-ensamblaje, el auto-ensamblaje de los agregados celulares puede realizarse, *p. ej.*, en una cámara o en un líquido en movimiento aplicando, por ejemplo, restricciones mecánicas, esfuerzo cortante utilizando un líquido, compresión, sacudimiento, campos eléctricos, campos magnéticos o gradientes de morfógenos y/o factores de crecimiento. La forma, el tamaño y el o los tipos celulares de los agregados supracelulares son importantes en la etapa inicial del ensamblaje para fomentar la organización a mesoescala y crear la estructura heterogénea de interés. El auto-ensamblaje de los agregados normalmente tarda varias horas. Típicamente, tarda como máximo un día. La estructura de interés puede incluir el simple ensamblaje de agregados esféricos en forma de un cilindro o el conjunto más complejo de agregados esféricos en bloques (cubos, triángulos, *etc.*) que luego pueden ensamblarse en construcciones mayores. Por ejemplo, utilizando las propiedades plásticas de las células, se pueden diseñar cámaras con formas compensadas, que dan como resultado las formas de construcción de tejido deseadas. El diseño y las estructuras de esas construcciones deberían fomentar la creación de un entorno local que conduzca a una mayor remodelación y desarrollo del tejido.

Algunos ejemplos ilustrativos de condiciones que pueden utilizarse para fomentar el auto-ensamblaje de los agregados celulares en una construcción de tejido incluyen el tipo de célula, el medio utilizado para cultivar el tejido y el tiempo de incubación en, *p. ej.*, la matriz de micropocillos antes de la transferencia a la cámara final.

La segunda fase implica la remodelación y/o reorganización de las células y/o el tejido en la construcción. En esta etapa, se aplican condiciones que inducen la morfogénesis del tejido en la construcción del tejido. El término "morfogénesis" en esta solicitud pretende dar a entender una serie coordinada de eventos moleculares y celulares que conforman la estructura de la construcción de tejido. La morfogénesis tisular puede estar gobernada por migración de células, tracción física de células, diferenciación de células, producción local de factores biológicos solubles o insolubles (matriz extracelular) o combinaciones de los mismos. La remodelación y/o reorganización puede implicar, además, la compactación de las células y/o el tejido en la construcción del tejido. Esta segunda fase se puede caracterizar como un desarrollo adicional de la construcción de tejido y puede guiarse de nuevo aplicando parámetros artificiales tales como restricciones mecánicas, compresión, sacudimiento, campos eléctricos, campos magnéticos, la acción de objetos embebidos en la construcción y sujetos o no a fuerzas externas, o gradientes de morfógenos y/o factores de crecimiento. Típicamente, la combinación de agregados celulares de diferentes tamaños en un líquido agitado fomenta la formación de disposiciones modeladas. La combinación de agregados celulares de formas complementarias fomenta la formación de tejidos con unidades repetitivas.

La remodelación y/o reorganización puede implicar, por ejemplo, aplicar restricciones geométricas (tales como el uso de una cámara con geometría específica) a la construcción de tejido. Esto puede inducir la auto-organización en los tejidos (tales como la compactación local, el crecimiento local de los capilares).

La forma geométrica del tejido en sí misma puede inducir la remodelación y/o reorganización local de las células, incluida la compactación de las células, el estrés local, el crecimiento local de las células endoteliales en los capilares sanguíneos.

40 Las células se pueden ensamblar en chips hechos de materiales biocompatibles que incluyen agarosa, PDMS o PLLA fundidos en obleas de silicón grabadas mediante un proceso de litografía convencional, o replicadas mediante estampado en caliente. Los polímeros pueden funcionalizarse adicionalmente para modificar su interacción con células recubiertas con polímeros (*p. ej.* PEG) o proteínas (*p. ej.*, BSA), patrones de proteínas adhesivas que fomentan la adhesión local de la construcción del tejido o topografías nanométricas y micrométricas. Los chips son del orden de una escala de centímetros y caben en las placas de pocillos clásicas de cultivo de células. Se generan pocillos del orden de 100 a 1500  $\mu\text{m}$  (tales como del orden de 500 a 1500  $\mu\text{m}$ ) en los que los agregados pueden auto-ensamblarse.

50 Dependiendo de los métodos que se utilizan para el auto-ensamblaje de las células y/o agregados celulares, se puede diseñar y preparar una amplia diversidad de formas constructivas utilizando el método tal como se describe en esta memoria. Por ejemplo, cuando se utilizan pocillos en los que los agregados se combinan para formar construcciones, la forma de los pocillos se trasladará a la forma de la construcción.

Además, el tamaño de la construcción puede variar ampliamente. Sin embargo, el tamaño máximo puede estar limitado por la distancia de difusión de oxígeno y nutrientes. Una forma de superar esto es, por ejemplo, mediante el uso de sistemas de perfusión o superfusión. Las construcciones tendrán normalmente un tamaño de al menos 500  $\mu\text{m}$ , o al menos 1 mm. El límite superior del tamaño puede ser, por ejemplo, de 4 mm o 1,5 cm.

5 Cuando se combinan los agregados celulares para obtener una construcción de tejido, el auto-ensamblaje puede ser asistido utilizando un biomaterial, *p. ej.*, para formar un armazón y proporcionar soporte mecánico o para ayudar a lograr una determinada forma deseada. Además, pueden incluirse biomateriales o factores bioactivos que conducen el desarrollo o la organización de la construcción de tejido. Los tipos de biomateriales que se pueden incorporar incluyen, pero no están limitados a: materiales cerámicos, biovidrios, materiales poliméricos (biodegradables o no biodegradables), metales, geles. Tipos de factores bioactivos que se pueden incorporar incluyen, pero no se limitan a: enzimas, receptores, neurotransmisores, hormonas, citoquinas, modificadores de la respuesta celular tales como factores de crecimiento y factores quimiotácticos, anticuerpos, vacunas, haptenos, toxinas, interferones, ribozimas, agentes anti-sentido, plásmidos, ADN y ARN. Se prefieren objetos biodegradables y/u objetos metálicos. Es posible combinar el objeto con células vivas, combinar el objeto con agregados supracelulares y/o combinar el objeto con construcciones de tejido. El objeto puede así ser introducido en los pasos a) o b) y/o en los pasos c) o d). Los objetos metálicos se pueden utilizar para modificar el agregado celular o el tejido mediante el uso de un campo eléctrico o magnético.

15 Un aspecto importante de la invención tal como se describen en esta memoria es que los agregados, después de haber sido combinados, se auto-ensamblarán formando tejidos biológicos, que pueden variar en complejidad. Para este fin, los agregados de diferentes tipos de células se combinan preferiblemente. Los agregados de los tipos de células que componen un tejido se pueden combinar para replicar dicho tejido. Características a incorporar en los tejidos pueden incluir, pero no se limitan a una red vascular (células endoteliales y células/pericitos de músculo liso), una red neuronal (células neurales), una red linfática (células endoteliales linfáticas). Por ejemplo, para el tejido del músculo esquelético se pueden combinar agregados de células del músculo esquelético, células neurales, células endoteliales, células/pericitos del músculo liso y células endoteliales linfáticas.

25 Sin pretender estar ligados a teoría alguna, se postula que el auto-ensamblaje de los agregados en estructuras tisulares (al que también se alude como morfogénesis tisular) puede ser provocado por la migración de células, la tracción física o la compactación de células, la producción local de factores biológicos solubles o insolubles (matriz extracelular), diferenciación de células o combinaciones de las mismas.

30 Las construcciones de tejido obtenidas se pueden utilizar para diversas aplicaciones. Por ejemplo, pueden servir como una plataforma para crear construcciones para la reparación de tejidos, o como una plataforma para estudiar el desarrollo de tejidos (como herramienta científica), como un modelo de ensayo *in vitro* para el ensayo de compuestos en farmacología o cosméticos, etc. La invención se elucidará ahora adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos no restrictivos.

### EJEMPLOS

35 El microdispositivo mostrado en la Figura 2, que consiste en una matriz de micropocillos de diversas dimensiones (diámetro del pocillo, espaciado y profundidad) fabricados en PDMS, se utilizó para la formación espontánea y simultánea de un cierto número de esferoides a microescala, de forma rápida, controlada y reproducible (véase la Figura 3). La formación de agregados es sencilla y requiere cantidades reducidas de células y factores biológicos. El tamaño de los microtejidos se puede ajustar (~ 25 a 100.000 células) y es más adecuado para fines de obtención de imágenes. Los autores de la invención han estudiado en primer lugar las propiedades óptimas del material, *es decir*, dando poca/ninguna adherencia celular y una fuerte agregación celular para la preparación de esferoides basados en hMSCs (siglas inglesas de células madre mesenquimales humanas) o HUVECs (siglas inglesas de células endoteliales de la vena umbilical humana) y han investigado notablemente la composición de PDMS (relación de agente de curado:base) en combinación con diversos revestimientos. Ambos parámetros influyen enormemente en la adherencia y agregación celular. Los resultados oscilan entre una adherencia fuerte a nula en la superficie y un ensamblaje celular entre la "suspensión" celular aislada y la agregación celular extensa. La mejor eficacia en la formación de esferoides se observa con un recubrimiento de PEG de PM 35.000 y una composición de PDMS 45 10:0,5. PDMS 10:0,5 proporciona la adherencia celular más pequeña y PEG de PM 35.000 a una concentración de 50 mg/ml fomenta la agregación celular (véase la Tabla 1). Los esferoides resultantes exhiben un tamaño en el intervalo de cientos de micras, dependiendo del tamaño de los micropocillos y de la densidad de siembra celular, véase la Figura 4.

50 Los agregados celulares se pueden luego recoger y ensamblar en diferentes formas, y se pueden combinar diferentes tipos de células. Aquí, los autores de la invención presentan el caso del ensamblaje de agregados de hMSC y HUVEC en un molde de agarosa. El molde se fabrica por replicación de agarosa en un patrón de acero inoxidable (1 x 1 x 10 mm), véase la Figura 5. Se combinaron 5.000 agregados celulares de cada uno de los tipos de células en este molde. Se auto-ensamblaron en un tubo estratificado con una capa de HUVEC que rodea un núcleo de hMSC (Figura 7). Este proceso de auto-ensamblaje se debe a la tensión superficial diferencial de los dos tipos de agregados que fomentan la segregación. Con el tiempo, la construcción se remodelará de acuerdo con los procesos biológicos de la angiogénesis y conducirá a un cilindro vascularizado de tejido denso.



Tabla 1: Preparación de microtejidos en micropocillos basados en PDMS recubiertos: agregación y adherencia celular sobre la superficie dependiendo de la composición de PDMS y la naturaleza del recubrimiento.

Recubrimiento Composición de PDMS	Ø	Fibronectina	BSA 10 mg/ml	BSA 50 mg/ml	PEG 300 10 mg/ml	PEG 35.000 50 mg/ml	Agarosa
10:0.5	Adherencia: + Agregación: +	Adherencia: + Agregación: ++	Adherencia: --- Agregación: --	Adherencia: +++ Agregación: ++	Adherencia: - Agregación: +	Adherencia: Sin Agregación: +++	Adherencia: Sin Agregación: ---
10:1	Adherencia: -- Agregación: --	Adherencia: - Agregación: +++	Adherencia: --- Agregación: --	Adherencia: +++ Agregación: +++	Adherencia: --- Agregación: -	Adherencia: + Agregación: +++	Adherencia: --- Agregación: ---
10:3	Adherencia: +++ Agregación: ++	Adherencia: +++ Agregación: +	Adherencia: - Agregación: +++	Adherencia: +++ Agregación: +	Adherencia: + Agregación: +	Adherencia: + Agregación: +	Adherencia: ++ Agregación: ++

En la Figura 7, las células madre mesenquimales humanas de la médula ósea y las células endoteliales de la vena umbilical humana se cultivaron por separado y se agregaron a chips. Los chips están hechos de PDMS recubiertos con BSA 50 mg/ml. Los micropocillos en el chip son de 200 micras de diámetro y 300 micras de profundidad. Se dejó que las células se agregaran para formar esferoides durante 24 horas. hMSC se cultivan en DMEM + glutamax, dexametasona 100 nM (Sigma), Pen/Strep al 1% (100 U / 100 µg/ml, GIBCO), 50 mg/ml de premezcla ITS-plus (BD), 50 µg/ml de ácido ascórbico (Sigma), 40 µg/ml de prolina (Sigma), 100 µg/ml de piruvato de sodio (Sigma). HUVEC se cultivan y se agregan en medio EGM2 (Lonza).

Se transfirieron 5.000 esferoides de cada uno de los tipos de células (10.000 esferoides en total) a un chip de agarosa con una zanja (1 mm de ancho, 1 mm de profundidad y 1 cm de longitud). Esta agarosa (4%) se moldea en un molde de acero inoxidable.

Los 10.000 esferoides se agregaron rápidamente y formaron una construcción de tejido cilíndrico. Esta construcción se cultivó durante 6 días y se seccionó e inmunotizó los días 3 y 6 para CD31 y Dapi.

5 Se observó un auto-ensamblaje de los dos tipos de células en dos capas concéntricas el día 3, en donde las HUVEC están formando una capa externa y el hMSC un núcleo interno. Esto fue seguido por una invasión de la HUVEC en el centro de la construcción el día 6 y la formación de una red capilar primitiva.

10 En la Figura 8, los esferoides de hMSC se produjeron como se describió anteriormente. Se transfirieron 15.000 esferoides de 100 micras de diámetro a un chip de agarosa con pocillos de diferentes formas (*entre otros*, cuadrados, triángulos y círculos). El chip de agarosa (4% de agarosa) se moldea en un molde de PDMS. Los pocillos tienen un área de superficie total de 0,64 mm<sup>2</sup> y una profundidad de 1 mm. Los esferoides se sembraron en el chip y formaron tejido de mesoescala de tamaño y forma definidos. Esos tejidos de mesoescala se cosecharon después de 24 horas y se pueden combinar y utilizar para construir modelos de tejidos o implantes de tejidos.

15 La Figura 9A muestra que el tamaño de los bloques de construcción depende del número de células sembradas y del tamaño de los micropocillos. Utilizando células madre mesenquimales humanas y dos tamaños diferentes de micropocillos (200 y 400 µm), se ensamblaron bloques de construcción de 30 a 150 µm. En la Figura 9B se muestra que también diferentes medios de cultivo pueden inducir diferentes niveles de compactación. Además, como se muestra en la Figura 9C, diferentes tipos de células muestran una plasticidad diferente y el mantenimiento de la forma a lo largo del tiempo. Esta plasticidad disminuyó con una incubación más prolongada en la matriz de micropocillos. Para cada uno de los tipos de célula y cada uno de los medios de cultivo, se ha de ajustar un tiempo de incubación en la matriz de micropocillos.

20 La Figura 10 muestra que la compactación de la construcción de tejido no es uniforme para todas las formas. Las esquinas son regiones de mayor compactación. Las formas compensadas se pueden diseñar para fomentar la remodelación del tejido en una geometría deseada.

25 En la Figura 11 se muestra que tanto la compactación local como el estrés local del tejido dependen de la forma geométrica. La Figura 11A muestra una tinción nuclear de cortes de 7 µm. Se observó una compactación local de las células (los núcleos están más cerca unos de otros) en el exterior de los tejidos en comparación con el interior en discos (imágenes de la izquierda) y los efectos de las puntas con la compactación celular local en las puntas de los tejidos triangulares (imágenes de la derecha). La Figura 11B muestra una tinción del citoesqueleto de cortes de 7 µm. Se observaron regiones de poblaciones de células F-actina más intensas. La forma de los tejidos creó microambientes locales de estrés.

30 Como se puede ver en la Figura 12, es posible ensamblar adicionalmente en tejidos de tamaño clínicamente relevante (tal como la escala de centímetros). Los tejidos se fusionan espontáneamente y pueden manipularse, logrando así relevancia clínica.

Figura 1. Parte superior: esquema ilustrativo de la invención.

Parte inferior: herramientas que pueden utilizarse para poner en práctica la invención.

35 Figura 2. Imagen SEM de una matriz de micropocillos (diámetro 100 µm, profundidad 350 µm) para la formación espontánea de microtejidos. En la inserción, vista ampliada de los pocillos moldeados en PDMS.

Figura 3. Esferoides preparados a partir de células HUVECs en un microsistema PDMS (10:0,5) recubiertos con PEG de PM 35.000 a 50 mg/ml. Los micropocillos tienen un diámetro de 200 µm y una profundidad de 350 µm.

40 Figura 4. Esferoides preparados a partir de células progenitoras mesenquimales derivadas de médula ósea humana en un microsistema PDMS (10:0,5) recubierto con PEG de PM 35000 a 50 mg/ml. Los micropocillos tienen un diámetro de 200 µm y una profundidad de 350 µm. La imagen A se toma justo después de la siembra y la imagen B después de 2 días de cultivo.

45 Figura 5. Molde de acero inoxidable (izquierda) utilizado como plantilla para replicar una cámara de agarosa (derecha) utilizada para ensamblar agregados.

Figura 6. Agregados de HUVEC y hMSC ensamblados en la cámara de agarosa justo después de la siembra después de 3 días de cultivo. La anchura de la cámara es de 1 mm, la profundidad de la cámara es de 1 mm y la longitud de la cámara es de 1 cm.

Figura 7. Auto-ensamblaje de agregados de diferentes tipos de células. Sección transversal del cilindro descrita anteriormente después de 3 días (A) y 6 días (B). El día 3 se puede observar la segregación de los tipos de células con HUVEC, en rojo, formando una capa exterior. Después de 6 días, tuvieron lugar los procesos de angiogénesis y se formaron capilares en la construcción del tejido.

5 Figura 8. Los agregados celulares de hMSC se pueden ensamblar para formar construcciones de tejido de diferentes formas para construir unidades de tejido que luego se pueden ensamblar en construcciones mayores. Paneles A y B: 15 minutos después de sembrar los agregados. Paneles C y D: 5 horas después de sembrar los agregados. Paneles E y F: se liberaron construcciones de tejido de los pocillos, 24 horas después de sembrar los agregados.

10 Figura 9. A El tamaño de los bloques de construcción depende del número de células sembradas y del tamaño de los micropocillos.

B Las diferentes composiciones de los medios de cultivo inducen diferentes niveles de compactación de los esferoides a lo largo del tiempo.

15 C Diferentes tipos de células muestran diferente plasticidad y mantenimiento de la forma a lo largo del tiempo.

Figura 10. Remodelación de la construcción de tejido en una geometría deseada utilizando formas compensadas.

Figura 11. A La compactación local del tejido depende de la forma geométrica.

B El estrés local del tejido depende de la forma geométrica.

Figura 12. Los tejidos pueden ensamblarse adicionalmente en tejidos de escala de centímetros.

20

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir *in vitro* una construcción de tejido, que comprende:
- 5 a) combinar células vivas para formar agregados supracelulares utilizando confinamiento espacial, en donde el confinamiento espacial en una matriz de micropocillos permite la condensación/agregación de dichas células para formar agregados celulares, y en donde dicho confinamiento espacial comprende una matriz de micropocillos que tiene un diámetro envolvente de 50-500  $\mu\text{m}$  y una profundidad en el intervalo de 100-1000  $\mu\text{m}$ .;
  - b) combinar dos o más de los agregados supracelulares en un molde o en un biomaterial que comprende macro-pocillos;
  - 10 c) aplicar condiciones que inducen el auto-ensamblaje dentro de los agregados supracelulares combinados para obtener la construcción de tejido; y
  - d) aplicar condiciones que inducen la morfogénesis tisular en la construcción de tejido,
- en el que dichas condiciones aplicadas en la etapa c) y dichas condiciones aplicadas en la etapa d) implican aplicar restricciones geométricas a la construcción de tejido.
- 15 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha morfogénesis de tejido comprende la migración y/o diferenciación de células.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la forma de al menos algunos de los micropocillos es tal que los agregados resultantes pueden auto-ensamblarse de acuerdo con el principio de la cerradura con llave.
- 20 4. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que 2-500.000 células por micropocillo se combinan para formar un agregado supracelular.
5. Un método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que 10-10.000 células por micropocillo se combinan para formar un agregado supracelular.
- 25 6. Un método de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, en el que la matriz de micropocillos se prepara por la tecnología de microchip, estampado en caliente, sinterización selectiva con láser, fabricación en forma libre de sólidos o micromoldeo con separación de fases.
- 30 7. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las células vivas son del mismo o de diferente tipo de célula y se combinan para formar los agregados supracelulares, en donde las células se seleccionan del grupo que consiste en células endoteliales, células de músculo liso, células de músculo estriado, células neurales, células del tejido conjuntivo, osteoblastos, osteoclastos, condrocitos, hepatocitos, cardiomiocitos, miocitos, células de Schwann, células uroteliales, células parenquimatosas, células epiteliales, células epiteliales secretoras exocrinas, células epiteliales absorbentes, células epiteliales queratinizantes, células de secreción de la matriz extracelular o células no diferenciadas, células embrionarias, células progenitoras, células madre (mesenquimales), células de la médula ósea, células satélite, fibroblastos y otras células precursoras.
- 35 8. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que los agregados supracelulares tienen un tamaño medio de partícula de 20-400  $\mu\text{m}$ , según se mide por microscopía óptica.
9. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el biomaterial se elige del grupo que consiste en materiales cerámicos, biovidrios, vidrios, materiales poliméricos biodegradables, materiales poliméricos no biodegradables y metales.
- 40 10. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que la matriz de micropocillos comprende al menos dos micropocillos que tienen un tamaño y/o una forma diferentes.
11. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que los micropocillos están hechos de agarosa, PEGF (polietilenglicol) o PDMS y/o en el que la superficie de los micropocillos está recubierta con uno o más compuestos capaces de reducir y/o prevenir la adhesión celular.
- 45 12. Un método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el compuesto capaz de reducir y/o prevenir la adhesión celular es PEG, BSA, colágeno y/o fibronectina.

13. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las células vivas se combinan en presencia de fibronectina y/o colágeno.
- 5 14. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las propiedades de la superficie, la carga magnética y/o la carga eléctrica de los agregados supracelulares se modifican antes de combinar dos o más de los agregados supracelulares.
15. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que los agregados supracelulares se combinan en un líquido en movimiento y/o en el que los agregados supracelulares se combinan en un micropocillo que tiene un diámetro envolvente de al menos 500  $\mu\text{m}$ .
- 10 16. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las condiciones en la etapa c) comprenden una o más condiciones seleccionadas del grupo consistente en restricciones mecánicas, compresión, sacudimiento, campos eléctricos, campos magnéticos y gradientes de morfógenos o factores de crecimiento.
- 15 17. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que en la etapa a) o b) las células vivas o el agregado supracelular se combinan con un objeto y/o en el que en la etapa c) o d) la construcción de tejido se combina con un objeto para inducir una respuesta local.
18. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa a) comprende ajustar el tiempo de incubación en la matriz de micropocillos para obtener una plasticidad deseada de los agregados supracelulares.

Figura 1

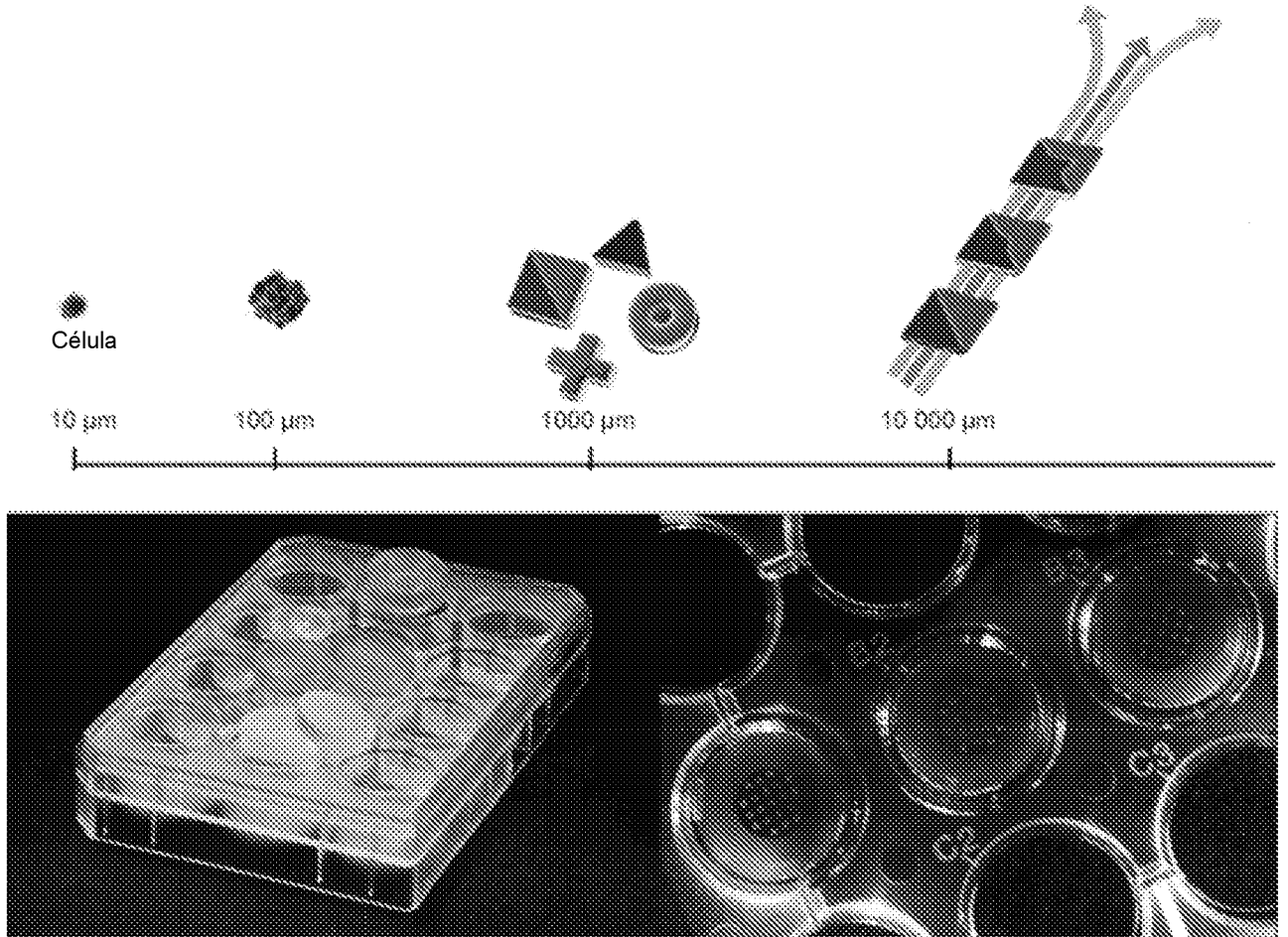


Figura 2

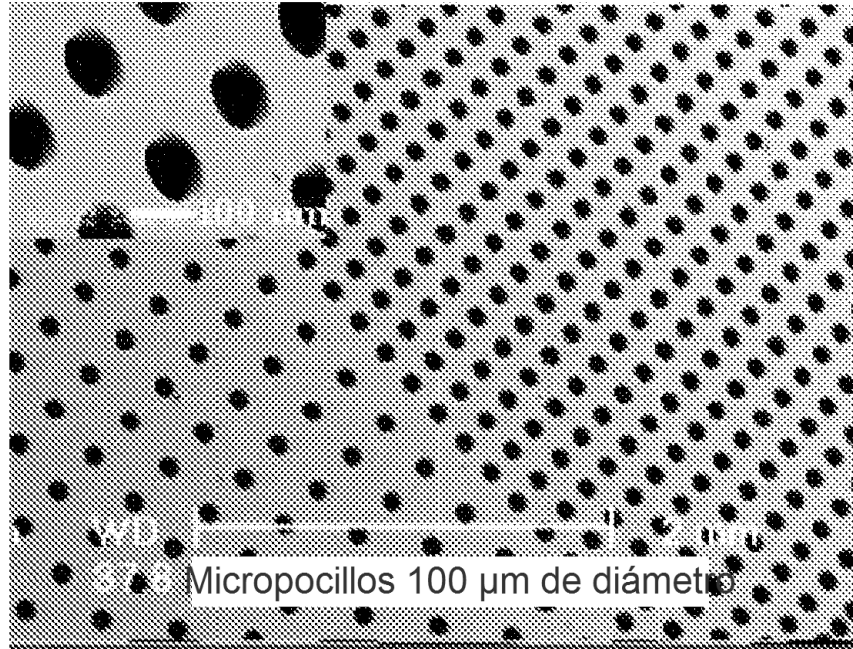


Figura 3

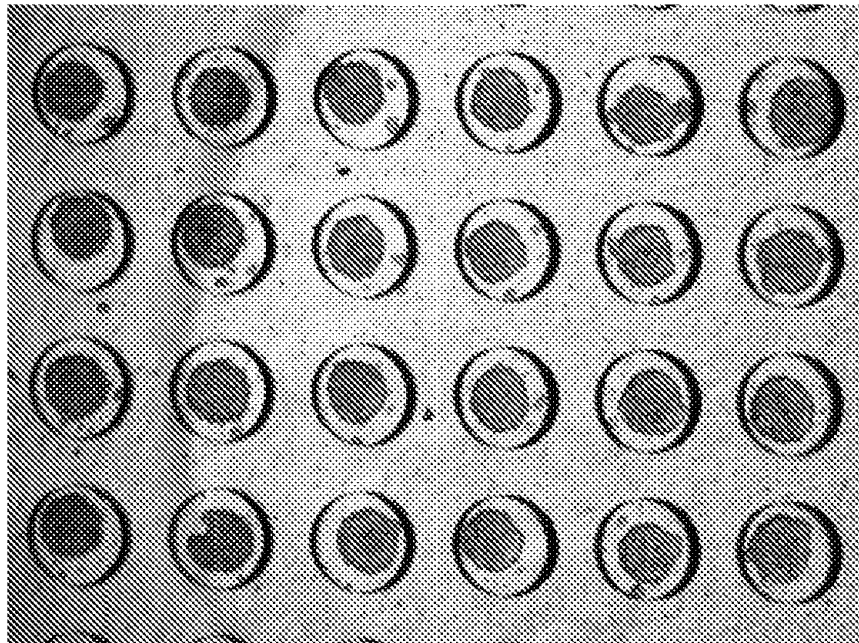
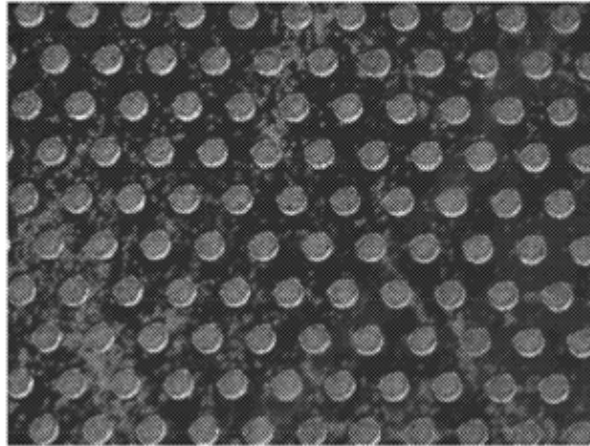


Figura 4

A



B

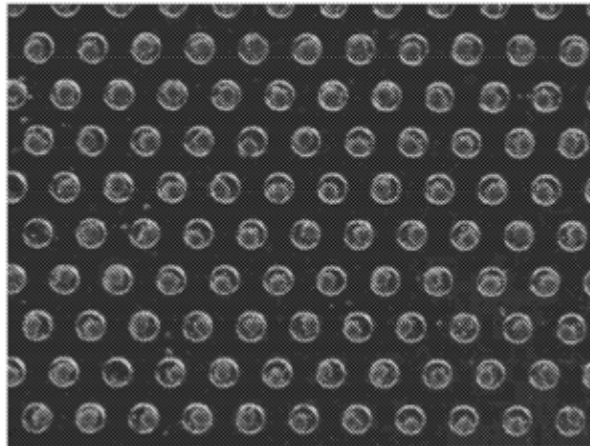




Figura 5

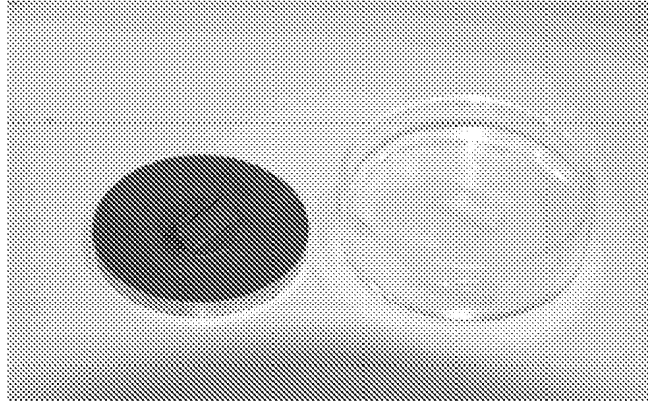


Figura 6

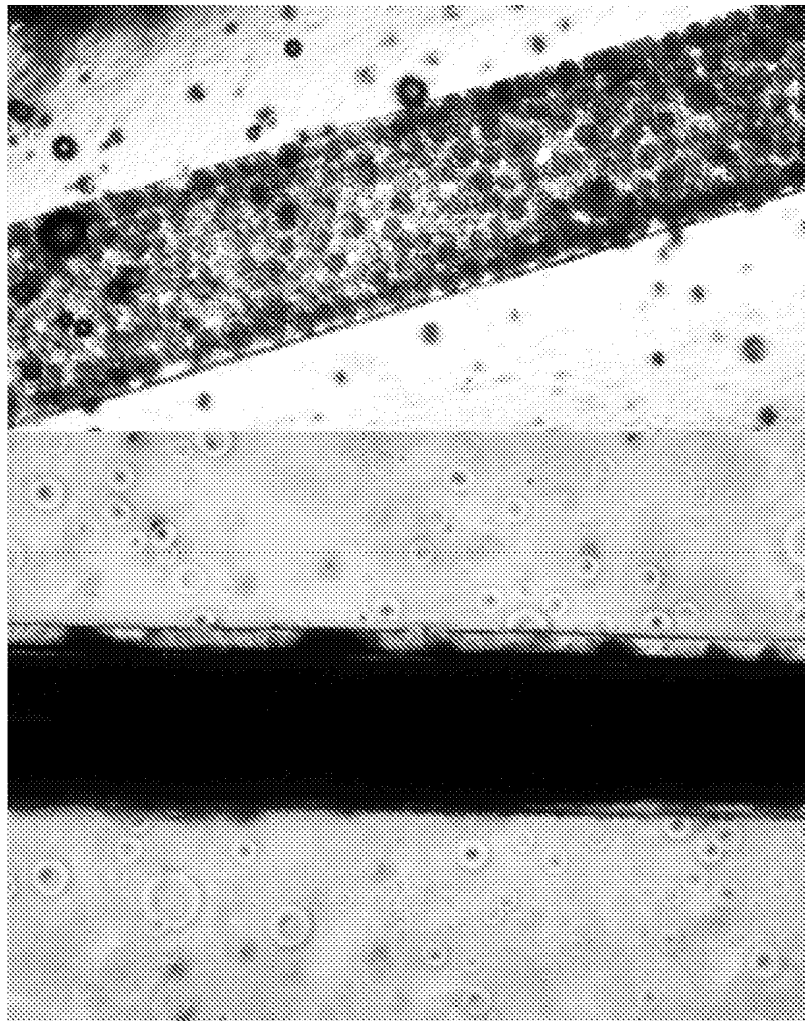
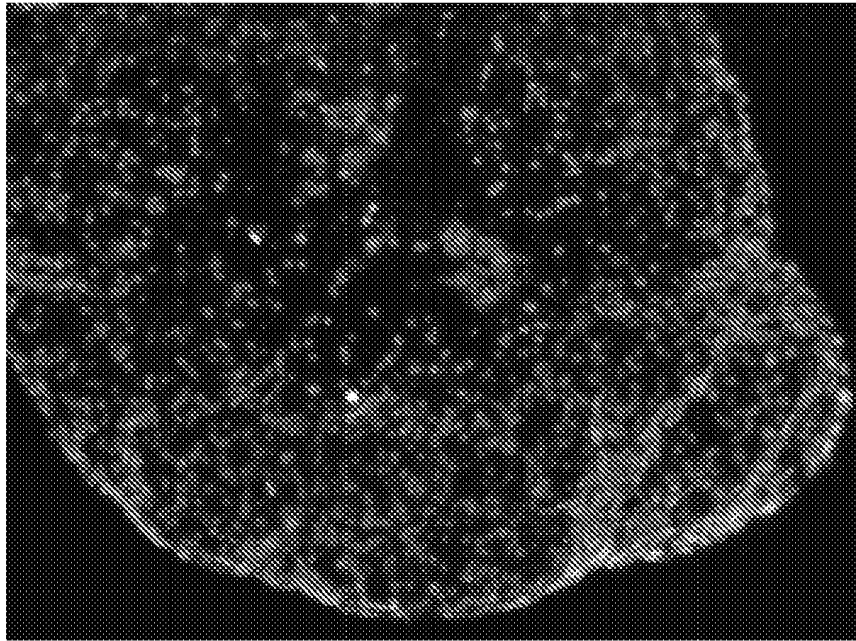


Figura 7

A



B

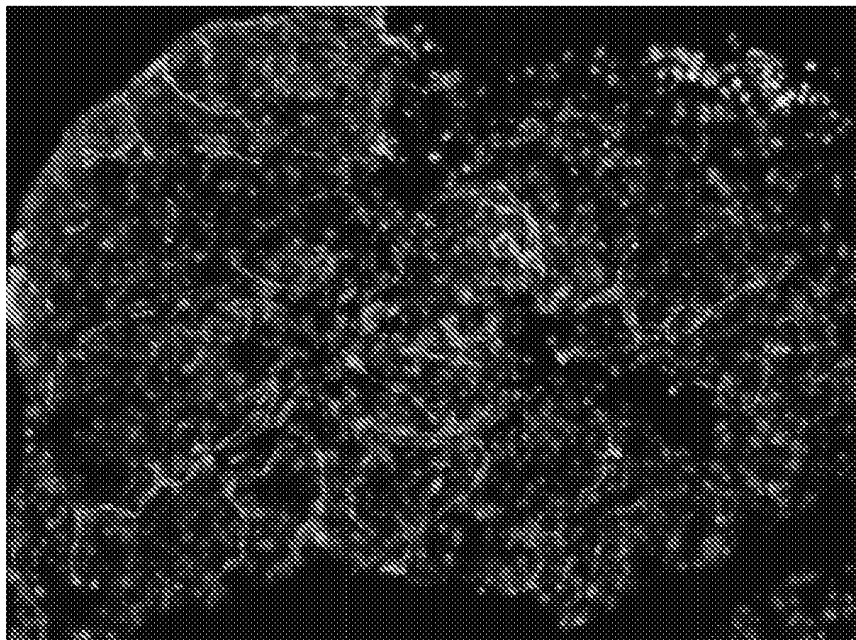
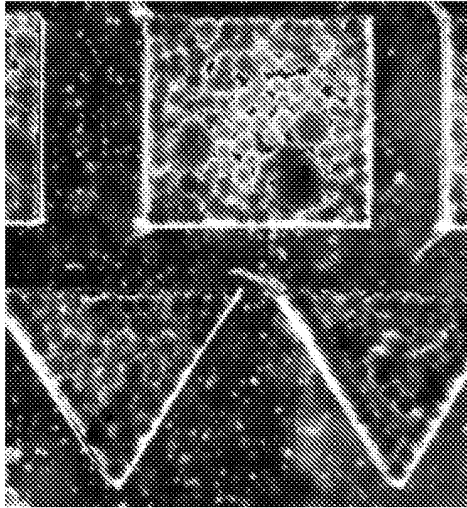
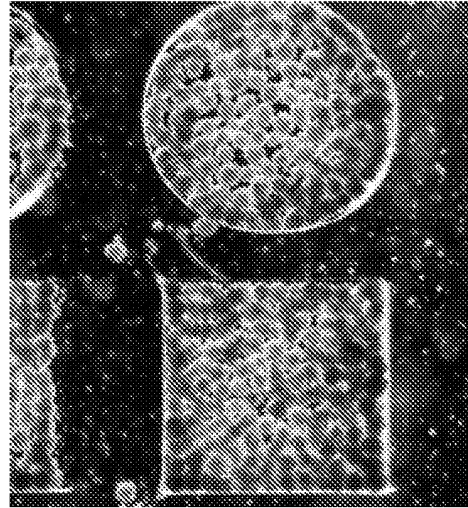


Figura 8

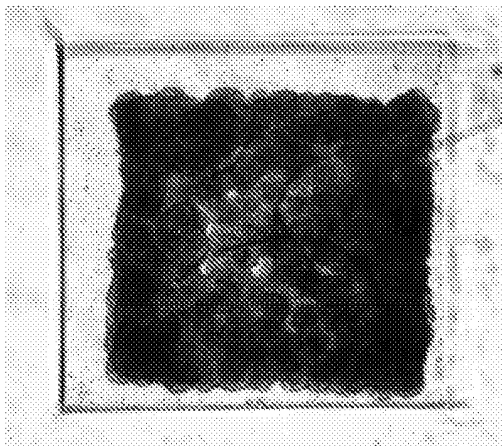
A



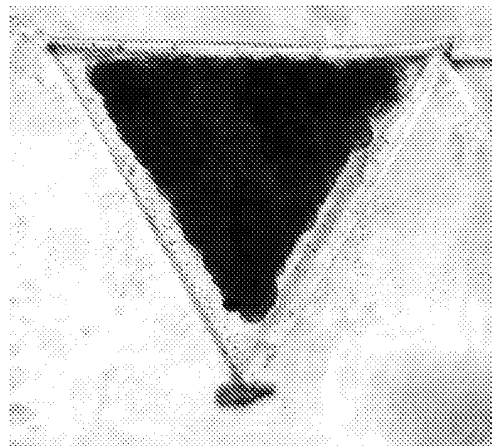
B



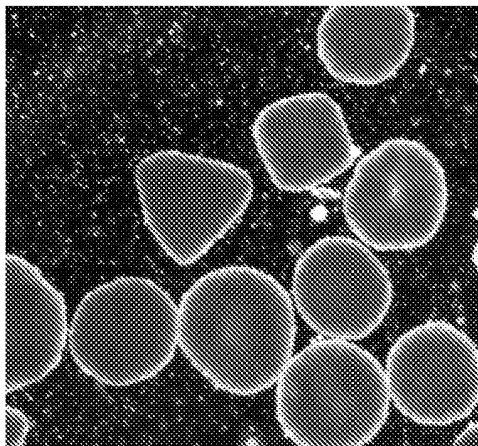
C



D



E



F

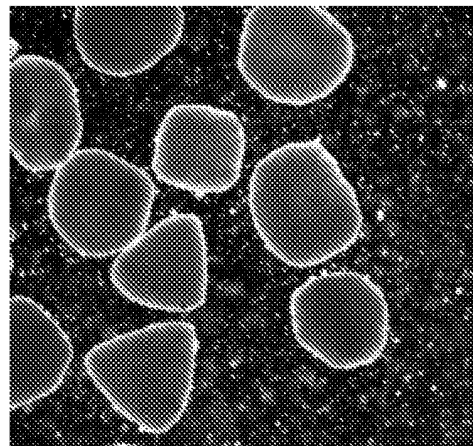


Figura 9

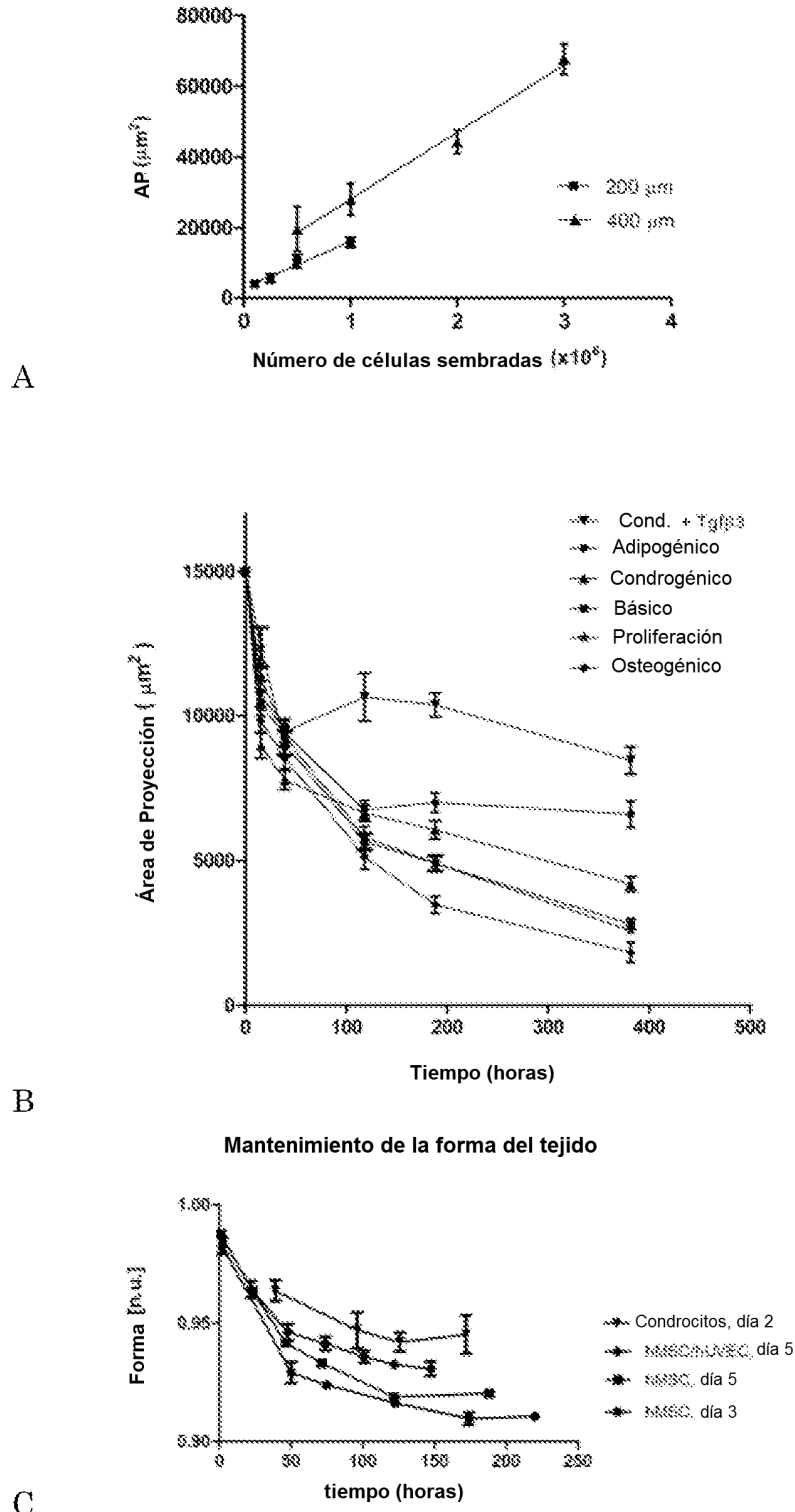


Figura 10

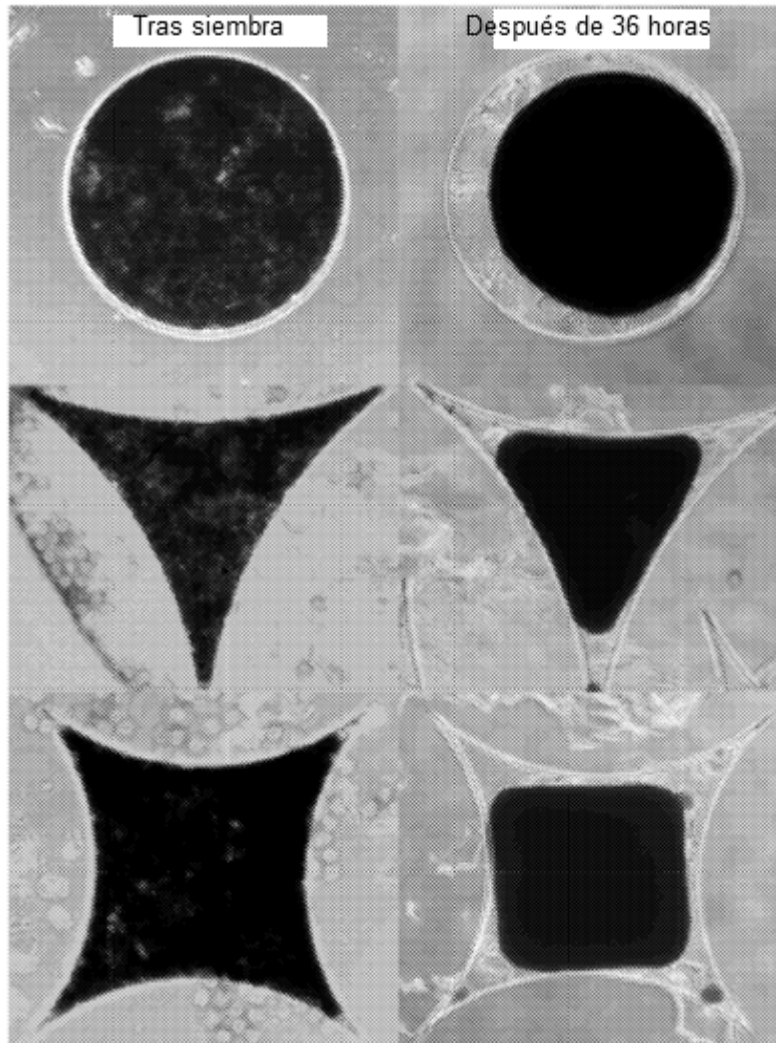
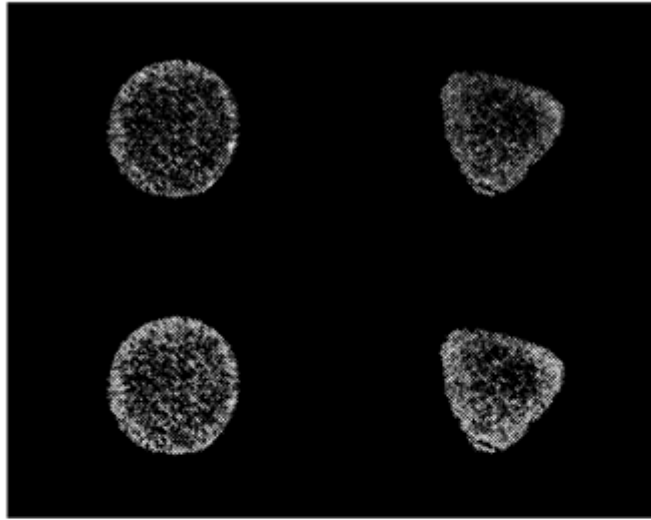
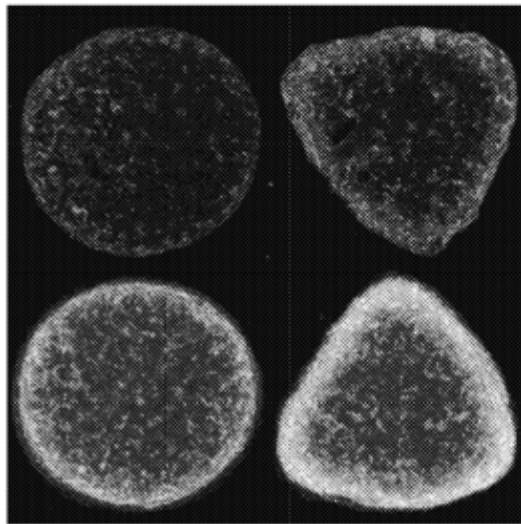


Figura 11



A



B

Figura 12

