

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 713 559**

51 Int. Cl.:

**C12M 3/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2003 E 10186252 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2018 EP 2330181**

54 Título: **Sistema automatizado de ingeniería de tejidos**

30 Prioridad:

**08.04.2002 US 370209 P**

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

**22.05.2019**

73 Titular/es:

**OCTANE BIOTECH INC. (100.0%)  
640 Catarqui Woods Drive  
Kingston, ON K7P 2Y5, CA**

72 Inventor/es:

**SMITH, TIMOTHY, J.N.;  
PUGH, SYDNEY, M.;  
PECARIC, MARTIN, R.;  
HAGG, RUPERT;  
TOMMASINI, ROBERTO;  
LARCHER, YVES y  
MISENER, D. LOWELL**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 713 559 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**

Sistema automatizado de ingeniería de tejidos

**Campo de la invención**

5 Esta invención se refiere a dispositivos, métodos y sistemas para el cultivo, proliferación, diferenciación, producción y mantenimiento automatizados de productos de ingeniería de tejidos. Tales sistemas, métodos y productos encuentran uso en diversos ámbitos clínicos y de laboratorio.

**Antecedentes de la invención**

10 A lo largo de esta solicitud, se citan varias referencias entre paréntesis para describir más completamente el estado de la técnica a la que pertenece esta invención. Las descripciones de estas referencias se incorporan aquí como referencia en la presente divulgación. Durante los últimos años, los investigadores han desarrollado y utilizado diferentes técnicas de cultivo celular y de ingeniería de tejidos para el cultivo y la producción de diversos tipos de implantes celulares. Tales sistemas están descritos, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos números 5.041.138, 5.842.477, 5.882.929, 5.891.455, 5.902.741, 5.994.129, 6.048.721 y 6.228.635. También se han desarrollado sistemas de biorreactores para el cultivo de células e implantes celulares y están descritos, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos números 5.688.687, 5.728.581, 5.827.729 y 6.121.042. Otros ejemplos de sistemas y métodos de cultivo celular y de ingeniería de tejidos están descritos en los documentos WO 99/47922 y US 5994129. El documento WO 99/47922 se refiere a matrices de tejidos a microescala y a su construcción, donde la matriz de tejido a microescala se construye a partir de una micromatriz sembrada con células que forma un microtejido y/o un microórgano, y a métodos para utilizar las matrices de tejidos a microescala en una variedad de sistemas y ensayos. El documento US 5994129 se refiere a una casete portátil para uso en combinación con un instrumento procesador y/o un instrumento incubador, para recibir, mantener y cultivar células biológicas *ex vivo* sin exponer las células al ambiente externo, en donde ambos instrumentos están configurados para acondicionar la casete portátil durante las fases del proceso de cultivo celular, sin perturbar el sistema estéril de la casete.

25 Los métodos y sistemas mencionados antes generalmente emplean técnicas de cultivo de laboratorio convencionales que utilizan equipo de cultivo estándar para la siembra sobre andamiaje de células de poblaciones de células seleccionadas. Por tanto, los implantes generados comprenden simplemente poblaciones de células proliferadas cultivadas sobre un tipo de soporte de biopolímero donde cualquier manipulación del entorno celular se limita a la producción de citocinas de células endógenas presentes en cualquier cultivo celular estándar, y a la aplicación de tensiones de cizallamiento y/o físicas debido a la circulación de medios de cultivo celular y a la manipulación física del soporte sobre el que se siembran las células. Los sistemas no abordan ni son capaces de generar un implante de tejido que comprenda células proliferadas y diferenciadas representativas de tejidos en desarrollo *in vivo* y además integradas dentro de un andamiaje seleccionado que se pueda integrar satisfactoriamente *in vivo*. Además, los métodos y sistemas conocidos no son capaces de llevar a cabo de manera multifuncional todas las etapas de la digestión de tejidos de biopsia para producir células desasociadas, la subsiguiente siembra de células sobre un sustrato de proliferación, la expansión del número de células, la diferenciación controlada, la formación de tejido y la producción de un implante de tejido dentro de un único sistema automatizado de ingeniería de tejidos. Esto se debe principalmente a que los sistemas de cultivo conocidos no son sofisticados porque no son capaces de evaluar y manipular automáticamente el entorno cambiante que rodea al implante en desarrollo, de manera que las células proliferen y se diferencien progresivamente en un implante deseado.

45 Además, los métodos y sistemas de cultivo convencionales son laboriosos y sufren los inconvenientes de la contaminación y de los diferentes grados de éxito del cultivo debido al error humano y a la falta de evaluación continua del funcionamiento. Los sistemas de cultivo convencionales requieren que la mayor parte de las etapas iniciales en la preparación de células para siembra (esto es, digestión de tejidos, selección de células) se realicen manualmente, lo que requiere mucho tiempo, no es fiable en términos de la calidad del tejido producido y es propenso a problemas de contaminación del cultivo. Los sistemas son incapaces de sostener la preparación automatizada de implantes de ingeniería de tejidos a partir de células primarias o precursoras debido a las limitaciones inherentes de diseño que restringen el proceso de cultivo de células y tejidos, a la incapacidad para monitorizar y modificar adecuadamente el entorno para sostener el desarrollo del tejido y a la ausencia de técnicas que permitan la implementación de medidas efectivas de control de calidad.

55 Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad real y no satisfecha de un sistema mejorado para la ingeniería de tejidos *in vitro* y *ex vivo* que pueda cumplir de manera consistente los requisitos operativos asociados con las diferentes etapas en el desarrollo y producción de implantes por ingeniería de tejidos. Es de particular importancia la capacidad de crear constructos de tejido funcionales donde las células presentes sean activas, diferenciadas y expresen ya una matriz extracelular. Esto implica más que la simple simulación del entorno maduro *in vivo* presente en el sitio del hospedante, y es sorprendentemente diferente a ella. Esto se debe a que la preparación de tejido funcional *de novo* requiere fundamentalmente que las células progresen a través de una serie de fases de desarrollo como parte de una secuencia *ex vivo*.

Con el fin de abordar los requisitos tanto clínicos como de investigación, se han desarrollado nuevos dispositivos, métodos y sistemas que evitan varias de las desventajas y limitaciones de las técnicas y sistemas de cultivo convencionales *ex vivo*.

**Sumario**

5 Se proporciona en la presente invención un método para (a) la proliferación automatizada de células autólogas, alogénicas o xenogénicas para uso en procedimientos de ingeniería de tejidos, comprendiendo dicho método:

10 - sembrar las células sobre o dentro de un sustrato o andamio de proliferación sostenido dentro de un biorreactor (202) conectado con un sistema (206) de reservorio y flujo de medios, teniendo dicho biorreactor (202) sensores (132, 134) para detectar los cambios en las condiciones ambientales que comprenden pH y temperatura y gases disueltos dentro de dicho biorreactor (202), cuyos sensores (132, 134) generan señales que son monitorizadas por un microprocesador (128), y cuyo microprocesador (128) controla y personaliza el ambiente interno del biorreactor (202) para cumplir así los requisitos de proliferación celular dentro del biorreactor (202);

15 - monitorizar y mantener condiciones adecuadas de cultivo dentro de dicho biorreactor (202) durante un periodo de tiempo suficiente para un nivel deseado de proliferación celular, en donde el estado de proliferación celular es evaluado indirectamente por la detección del recambio metabólico en función del tiempo y la evaluación del estado de proliferación celular comprende determinar el nivel de confluencia mediante monitorización a base de sensores.

Se proporciona también en la presente invención un sistema automatizado de cultivo celular y/o de ingeniería de tejidos que comprende:

20 - uno o más biorreactores (202) comprendiendo cada uno de dichos biorreactores (202) una o más cámaras adecuadas para facilitar las funciones fisiológicas celulares y/o la generación de una o más poblaciones de células y/o constructos de tejido en un modo de proceso secuencial y/o concurrente dentro de y/o entre las cámaras y/o biorreactores (202) deseados, durante el uso; en donde dichos uno o más biorreactores (202) están conectados operativamente con el sistema (206) de reservorio y flujo de medios,

25 - sensores (132, 134) asociados con dichos uno o más biorreactores (202) para detectar cambios en las condiciones ambientales que comprenden el pH y la temperatura y los gases disueltos dentro de dicho biorreactor (202), y cuyos sensores (132, 134) generan señales que son monitorizadas por un microprocesador (128);

- medios de detección del recambio metabólico en función del tiempo para evaluar el estado de proliferación celular;

- medios de monitorización a base de sensores para determinar el nivel de confluencia;

30 - un microprocesador (128) para efectuar dicho procesamiento biológico de modo secuencial y/o concurrente durante el uso, y que durante el uso controla y personaliza el ambiente interno del biorreactor (202) para cumplir así los requisitos de las diferentes fases de cultivo celular y/o desarrollo de tejido dentro del biorreactor (202), en respuesta a la monitorización de las señales generadas por los sensores (132, 134);

35 en donde, en uso, el microprocesador (128) monitoriza el progreso de la proliferación de células autólogas, alogénicas o xenogénicas, y opcionalmente, la diferenciación celular y/o el desarrollo de tejido, y mantiene condiciones de cultivo adecuadas dentro de dicho biorreactor (202) durante un periodo de tiempo suficiente para un nivel deseado de proliferación celular y opcionalmente, durante un periodo de tiempo suficiente para un nivel deseado de diferenciación celular y/o durante un periodo de tiempo suficiente para que dichas células expresen una matriz extracelular que proporciona el soporte estructural para el constructo de tejido.

40 Un sistema automatizado fácil de usar para el cultivo de células y la ingeniería de tejidos, descrito en la presente memoria, se puede utilizar en una variedad de ámbitos clínicos y de investigación tanto para aplicaciones humanas como veterinarias.

45 Como se usa en la presente memoria, "ingeniería de tejidos" se puede definir como "la aplicación de principios y métodos de ingeniería y ciencias de la vida hacia la comprensión y el desarrollo fundamentales de sustitutos biológicos para restaurar, mantener y mejorar las funciones de los tejidos". Con esta definición se pretende incluir procedimientos donde los sustitutos biológicos son células o combinaciones de diferentes células que pueden ser implantadas sobre un sustrato o andamio formado de materiales biocompatibles para formar un tejido, en particular un constructo de tejido implantable. Las células implicadas en los procedimientos de ingeniería de tejidos son autólogas, alogénicas o xenogénicas.

50 Un sistema de ingeniería de tejidos descrito en la presente memoria está diseñado para realizar todas las actividades en condiciones operativas estériles. El sistema es totalmente automatizado, portátil, de operación multifuncional y realiza/proporciona uno o más de lo siguiente:

- recepción/almacenamiento estéril de biopsia de tejido;

- monitorización automatizada del proceso de digestión.

- digestión del tejido de biopsia para producir células desasociadas;
- clasificación y selección de células, incluyendo la recogida segura de residuos;
- siembra de células sobre o dentro de un sustrato o andamio de proliferación;
- proliferación de células para aumentar las poblaciones de células;
- 5 - lavado de células y recogida de células;
- siembra de células sobre o dentro de un andamio o matriz de ingeniería de tejidos;
- diferenciación celular para permitir la especialización de la actividad celular;
- formación de tejido;
- estimulación mecánica y/o bioquímica para promover la madurez tisular;
- 10 - recogida de los constructos/implantes de ingeniería de tejidos para cirugía reconstructiva; y
- almacenamiento y transporte de tejido implantable.

El sistema de ingeniería de tejidos descrito en la presente memoria se puede preprogramar para realizar cada una de las etapas indicadas anteriormente, individualmente, secuencialmente o en ciertas secuencias parciales predeterminadas según se desee y se requiera. Además, cada una de estas etapas, o cualquier combinación de ellas, se realizan dentro de uno o más biorreactores en un módulo de ingeniería de tejidos. En funcionamiento, el sistema de ingeniería de tejidos es preprogramado y controlado automáticamente, por lo que requiere una intervención mínima por parte del usuario y, como resultado, aumenta la eficacia y la reproducibilidad del proceso de cultivo celular y/o ingeniería de tejidos a la vez que minimiza los riesgos de contaminación. El sistema de ingeniería de tejidos de la invención y los componentes del mismo pueden funcionar en condiciones de microgravedad y/o de gravedad cero donde tales sistema y componentes se usan en la investigación del espacio.

Un sistema descrito en la presente memoria está diseñado de tal manera que las células primarias o precursoras pueden ser aisladas de un tejido donante para posterior propagación, diferenciación y producción de un implante de tejido. Alternativamente, las líneas celulares también se pueden usar solas o en combinación con otras fuentes celulares.

La descripción se refiere a un sistema automatizado de ingeniería de tejidos, comprendiendo el sistema una carcasa que sostiene al menos un biorreactor que facilita las funciones celulares fisiológicas y la generación de constructos de tejido a partir de fuentes de células y de tejidos. La carcasa también sostiene un sistema de contención de fluidos que está en comunicación fluida con el biorreactor.

Asociados con la carcasa y/o con el biorreactor hay sensores que monitorizan los parámetros fisiológicos del fluido proporcionado en el sistema de contención de fluidos. Un microprocesador dispuesto dentro de la carcasa está conectado al biorreactor y al sistema de contención de fluidos y funciona para controlar el funcionamiento de estos. El microprocesador también puede controlar independientemente las condiciones ambientales dentro del sistema.

Se describe en la presente memoria, un sistema para ingeniería celular y tisular que comprende módulos de ingeniería de tejidos, portátiles, estériles, que tienen uno o más biorreactores que proporcionan la base para la digestión de tejidos, la siembra de células sobre un sustrato de proliferación, la proliferación celular, la siembra de células sobre un andamio de diferenciación, la diferenciación celular y la formación de tejido con la subsiguiente maduración hasta tejido funcional para implantación. El biorreactor está conectado operativamente con un sistema de flujo y reservorio de medios para el suministro de reactivos y la recogida de fluidos de desecho de una manera sin reflujo. El biorreactor y/o el sistema de flujo de medios incluyen opcionalmente componentes de intercambio de gases que utilizan membranas semipermeables que permiten la transferencia de productos gaseosos controlando de este modo los niveles de gases disueltos en los medios. El módulo de ingeniería de tejidos interactúa operativamente con una unidad base controlada por un microprocesador central que monitoriza automáticamente la progresión del proceso de cultivo celular o de ingeniería de tejidos y ajusta las condiciones ambientales para cumplir los requisitos de las diferentes fases de cultivo celular y desarrollo de tejido dentro del biorreactor. Las desviaciones de las condiciones ideales son detectadas por una variedad de sensores presentes dentro del biorreactor y las señales generadas son monitorizadas por el microprocesador central. Por tanto, los cambios en las condiciones ambientales tales como, pero sin limitarse a ellos, el pH, la temperatura y los gases disueltos se pueden monitorizar y modificar automáticamente según sea necesario. Además, el estado de la proliferación celular se evalúa indirectamente mediante la detección del recambio metabólico en función del tiempo (p. ej., pH, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, ácido láctico y consumo de glucosa). Además del control de las condiciones de proceso por el microprocesador central, el propio módulo de ingeniería de tejidos puede incluir opcionalmente un microprocesador secundario incorporado que funciona al unísono con el microprocesador central. El microprocesador del módulo de ingeniería de tejidos amplía las capacidades de procesamiento de datos del sistema de ingeniería de tejidos al realizar funciones específicas

directamente incorporado al módulo de ingeniería de tejidos, minimizando así las exigencias al microprocesador central.

5 Diferentes factores de crecimiento, citocinas, agentes experimentales, productos farmacéuticos, productos químicos, fluidos de cultivo y cualquier combinación de los mismos se pueden cargar y almacenar dentro de cualquiera de los reservorios localizados en el módulo de ingeniería de tejidos y se pueden transferir automáticamente al uno o más biorreactores según una secuencia preprogramada o como sea requerido por el implante de tejido en desarrollo. Los módulos de ingeniería de tejidos individuales son separables del sistema para su transporte sin comprometer la esterilidad de los constructos de ingeniería de tejidos presentes dentro del biorreactor. Dicha separación no afecta el procesamiento de ningún otro módulo presente dentro del sistema de ingeniería de tejidos. Además, el módulo de ingeniería de tejidos se puede considerar desechable después de completar una secuencia de ingeniería de tejidos, ya que esta práctica evita la contaminación derivada de un uso anterior.

10 En diversas realizaciones descritas en la presente memoria, el dispositivo y el sistema se pueden usar para digerir tejidos obtenidos mediante biopsia quirúrgica. En otra realización, las células se pueden filtrar y se puede seleccionar y aislar una población particular. En otra realización, las células digeridas se pueden proliferar para aumentar la población de las células. En otra realización adicional, las células se pueden sembrar y cultivar sobre un andamio o sustrato deseado (denominado también matriz). En una realización adicional más, las células se pueden diferenciar sobre y/o a lo largo de un andamio o sustrato deseado hasta que se obtenga la formación de tejido adecuado. En otra realización adicional, el tejido puede ser estimulado para promover la madurez del tejido. En otra realización más, se produce un implante de tejido que es adecuado para cirugía reconstructiva. En otra realización adicional, se puede realizar muestreo de células en cada fase de proliferación celular y progresión del desarrollo de una manera estéril sin efectos adversos sobre el propio cultivo. Cada una de las realizaciones mencionadas anteriormente se puede llevar a cabo sola o secuencialmente, según se desee. El rastreo de tales sucesos de procesamiento se puede realizar por el microprocesador central y/o el microprocesador basado en módulos para incorporación a los registros de control de calidad.

25 Un sistema de ingeniería de tejidos descrito en la presente memoria puede utilizar opcionalmente un compuesto de biomaterial sintético, Skelite™, descrito en la solicitud de patente de Estados Unidos N° 6.323.146 (cuyos contenidos se incorporan a la presente memoria como referencia) para mejorar el funcionamiento biológico. Brevemente, Skelite™ es un compuesto de biomaterial bioabsorbible aislado que comprende calcio, oxígeno y fósforo, en donde una porción de al menos uno de dichos elementos está sustituida con un elemento que tiene un radio iónico de aproximadamente 0,1 a 0,6 Angstroms. En una realización, se puede utilizar Skelite™ para mejorar la proliferación celular a través de su uso como un recubrimiento sobre las paredes del biorreactor, como una película delgada sobre el sustrato de proliferación, o como un andamio de proliferación tridimensional y por lo tanto de área superficial alta. Se puede demostrar que el uso de Skelite™ en la fase de proliferación:

- aumenta la tasa de proliferación;
- 35 - aumenta el rendimiento celular después de la etapa de proliferación;
- reduce el área superficial requerida para un rendimiento de células deseado;
- reduce la tendencia problemática de la desdiferenciación del fenotipo celular durante la proliferación; y
- mejora la unión de los factores de crecimiento al sustrato de proliferación.

40 En una realización adicional, se puede usar Skelite™ como un andamiaje reabsorbible para mejorar la diferenciación de las células y la subsiguiente formación de constructos de tejido. Se puede demostrar que el uso de Skelite™ en la fase de diferenciación:

- aumenta la productividad mejorando la fiabilidad de la fase de diferenciación;
- aumenta la integridad y por lo tanto la viabilidad biológica del constructo de tejido;
- permite flexibilidad en la configuración del constructo basada en diferentes formatos de andamios;
- 45 - permite que las fases de proliferación, diferenciación y formación de tejido se produzcan sobre un sustrato común;
- aumenta la unión de los factores de crecimiento al andamio de diferenciación; y
- mejora las propiedades de manipulación del constructo de tejido durante la implantación quirúrgica.

50 Se describe en la presente memoria un método y un sistema para la preparación de constructos de tejido a través de las etapas automatizadas de digestión, proliferación, siembra y diferenciación de células primarias o precursoras que se originan en un paciente, eliminando así los problemas inmunológicos y de transmisión de enfermedades. Se puede formar un implante a partir del cultivo controlado de diversos tipos de células, que incluyen, pero no se limitan a condrocitos, células estromales, osteoblastos, células nerviosas, células epiteliales, células madre y mezclas de las mismas.

- Un sistema descrito en la presente memoria, en una realización, incorpora uno o más módulos de ingeniería de tejidos desmontables, portátiles y que funcionan independientemente que incluyen uno o más biorreactores, sistema de reservorios de medios y de flujo de fluidos/medios. Cada módulo, y por lo tanto el biorreactor o biorreactores, está bajo el control automatizado de un microprocesador central. El módulo y el biorreactor o biorreactores asociados pueden estar configurados para diferentes aplicaciones especializadas, tales como las siguientes, pero sin limitarse a ellas:
- 5 - recepción/almacenamiento estéril de biopsia de tejido;
  - mezcla y suministro automatizados de reactivos de digestión;
  - monitorización automatizada del proceso de digestión;
  - 10 - digestión de tejido de biopsia para producir células desasociadas;
  - clasificación y selección de células, incluyendo la recogida segura de residuos;
  - lavado de células y recogida de células;
  - siembra de células sobre o dentro de un sustrato o andamio de proliferación;
  - mezcla y suministro automatizados de reactivos de proliferación;
  - 15 - proliferación de células para aumentar las poblaciones de células;
  - monitorización automatizada de las condiciones celulares, incluyendo la detección de la confluencia;
  - liberación celular controlada desde el sustrato o andamio de proliferación;
  - etapas de proliferación repetidas en tamaños de área superficial seleccionados para aumentar el número de células;
  - 20 - canalización de la población celular hacia uno o más andamios o matrices de ingeniería de tejidos;
  - siembra de células sobre o dentro del andamio o matriz de ingeniería de tejidos;
  - mezcla y suministro automatizados de reactivos de diferenciación;
  - monitorización automatizada de las condiciones de cultivo de células/tejidos;
  - diferenciación celular para permitir la especialización de la actividad celular;
  - 25 - formación de tejido;
  - estimulación mecánica y/o bioquímica para promover la madurez tisular;
  - recogida de los constructos/implantes de ingeniería de tejidos para cirugía reconstructiva; y
  - almacenamiento y transporte de células y/o tejido implantable.
- 30 Cuando se proporcionan dos o más biorreactores dentro del sistema ya sea sostenidos directamente dentro de la carcasa del sistema o ya sea sostenidos en un módulo de ingeniería de tejidos insertable en la carcasa, los biorreactores se pueden proporcionar conectados en serie e individualmente operables y controlados por el microprocesador o alternativamente, pueden ser operados y controlados independientemente dependiendo de la programación del microprocesador por parte del usuario y del resultado que se desea lograr. Además, cuando se proporcionan dos o más biorreactores dentro del sistema, los biorreactores y las cámaras internas pueden estar
- 35 conectados de tal manera que haya un intercambio de células y/o de tejidos de biorreactor a biorreactor.
- El biorreactor se puede fabricar en diferentes tamaños y configuraciones según sea necesario para sostener números y tamaños variables de andamios o sustratos de proliferación y diferenciación. El biorreactor se puede incorporar como parte de los componentes estructurales del módulo de ingeniería de tejidos. Alternativamente, el
- 40 biorreactor puede ser desmontable como un componente separado de los restantes componentes del módulo de ingeniería de tejidos. Si está presente como un componente discreto, el biorreactor se puede empaquetar por separado en un paquete estéril y se puede unir al módulo de ingeniería de tejidos utilizando técnicas de acceso estéril en el momento de uso. Además, las técnicas de acceso estéril permiten que el biorreactor se separe del módulo, una vez finalizado el proceso de ingeniería de tejidos, para un fácil transporte al quirófano en preparación para la recuperación de un constructo de tejido implantable recién formado.
- 45 El biorreactor y/o el módulo de ingeniería de tejidos se pueden rotar o agitar dentro del sistema general de ingeniería de tejidos mediante actuadores de control. La rotación puede permitir el uso beneficioso de la gravedad para

efectuar secuencias específicas de bioprocesado, tales como la siembra de células basada en la sedimentación y el intercambio de fluidos dentro del biorreactor.

5 El módulo de ingeniería de tejidos puede tener un código de barras o disponer de un chip de memoria para un rastreo rápido y preciso dentro del sistema de ingeniería de tejidos como externamente como parte del entorno clínico o experimental. Dicha tecnología de rastreo incorporada dentro del dispositivo de ingeniería de tejidos permite también el rastreo electrónico mediante los sistemas de información de una clínica para los registros de pacientes. Esto asegura que el módulo de ingeniería de tejidos y, por lo tanto, las células o los implantes de tejidos asociados sean codificados correctamente para asegurar la administración al paciente correcto y que el proceso se registra para los fines de facturación del hospital. El módulo y/o el biorreactor pueden utilizar también un código de barras y/o un chip de memoria de manera similar para un rastreo rápido y seguro de pacientes y muestras.

En la presente memoria, se describe un sistema automatizado de ingeniería de tejidos que comprende;

- una carcasa;

- al menos un biorreactor sostenido por dicha carcasa, facilitando dicho biorreactor las funciones celulares fisiológicas y/o la generación de uno o más constructos de tejido a partir de fuentes celulares y/o tisulares;

15 - un sistema de contención de fluidos sostenido por dicha carcasa y en comunicación fluida con dicho biorreactor,

- uno o más sensores asociados con uno o más de dichos carcasa, biorreactor o sistema de contención de fluidos para monitorizar los parámetros relacionados con dichas funciones celulares fisiológicas y/o la generación de constructos de tejido; y

- un microprocesador ligado a uno o más de dichos sensores.

20 En la presente memoria, se describe un sistema automatizado de ingeniería de tejidos que comprende;

- una carcasa;

25 - al menos un módulo de ingeniería de tejidos alojado de manera desmontable dentro de dicha carcasa, comprendiendo dicho módulo de ingeniería de tejidos un soporte estructural que contiene al menos un biorreactor, facilitando dicho biorreactor las funciones celulares fisiológicas y/o la generación de uno o más constructos de tejido a partir de fuentes de células y/o de tejidos, un sistema de contención de fluidos en comunicación fluida con dicho biorreactor y uno o más sensores para monitorizar los parámetros relacionados con dichas funciones de cultivo celular y/o de ingeniería de tejidos; y

- un microprocesador dispuesto en dicha carcasa y conectado a dicho módulo de ingeniería de tejidos, controlando dicho microprocesador el funcionamiento de dicho módulo de ingeniería de tejidos.

30 En la presente memoria, se describe un módulo de ingeniería de tejidos portátil y esterilizable, que comprende;

- un soporte estructural que contiene al menos un biorreactor, facilitando dicho biorreactor las funciones de cultivo celular y de ingeniería de tejidos;

- un sistema de contención de fluidos en comunicación fluida con dicho biorreactor; y

35 - uno o más sensores para monitorizar los parámetros relacionados con dichas funciones de cultivo celular y de ingeniería de tejidos.

En aspectos de esta realización, el biorreactor comprende una carcasa de biorreactor que tiene uno o más puertos de entrada y uno o más puertos de salida para el flujo de medios y al menos una cámara definida dentro de dicha carcasa de biorreactor para recibir células y/o tejidos y facilitar dichas funciones de cultivo celular y de ingeniería de tejidos. La cámara se puede seleccionar del grupo que consiste en una cámara de cultivo/proliferación celular, una cámara de diferenciación celular/formación de tejido, una cámara de digestión de tejido y combinaciones de las mismas. Además, la cámara alberga uno o más sustratos y/o andamios. En alguna realización de la invención, se pueden proporcionar dos o más cámaras conectadas operativamente dentro del biorreactor y pueden ser conectadas operativamente. Alternativamente, los dos o más biorreactores pueden ser independientemente operables o cooperativamente operables. En otros aspectos adicionales, las cámaras y/o biorreactores están conectados operativamente para proporcionar el intercambio de fluidos, células y/o tejidos entre las cámaras y/o los biorreactores. El andamio para uso en la presente invención se selecciona del grupo que consiste en un andamio poroso, un andamio poroso con gradiente de porosidad, un andamio reticulado poroso, un andamio fibroso, un andamio rodeado por una membrana y combinaciones de los mismos. Las cámaras también se pueden subdividir en zonas. Por ejemplo, una cámara de diferenciación/formación de tejido puede estar provista de una pluralidad de zonas para contener varios andamios. Se pueden proporcionar embudos o pasadizos similares entre cámaras dentro de un biorreactor. Además, se pueden proporcionar uno o más filtros en cualquier localización dentro de un biorreactor.

- Según otro aspecto más de la presente invención, se encuentra un biorreactor que proporciona un entorno para las funciones de cultivo celular y/o de ingeniería de tejidos seleccionadas del grupo que consiste en almacenamiento de biopsia de tejido, digestión de biopsia de tejido, clasificación celular, lavado celular, concentración celular, siembra celular, proliferación celular, diferenciación celular, almacenamiento celular, transporte celular, formación de tejido, formación de implante, almacenamiento de tejido implantable, transporte de tejido implantable y combinaciones de los mismos.
- 5 Se describe en la presente memoria, un biorreactor para facilitar y sostener funciones celulares y la generación de constructos de tejido implantables, comprendiendo dicho biorreactor;
- una carcasa de biorreactor;
- 10 - uno o más puertos de entrada y uno o más puertos de salida para flujo de medios;
- al menos una cámara definida dentro de dicha carcasa de biorreactor para facilitar y sostener funciones celulares y/o la generación de uno o más constructos de tejido a partir de fuentes de células y/o de tejidos; y
  - uno o más sensores para monitorizar los parámetros relacionados con dichas funciones celulares y/o la generación de constructos de tejido dentro de dicha al menos una cámara.
- 15 Una carcasa de biorreactor descrita en la presente memoria comprende una tapa que puede ser una tapa desmontable o integral con la carcasa del biorreactor.
- Las células y los tejidos se pueden seleccionar de células precursoras de huesos, cartílagos, huesos y cartílagos relacionados y sus combinaciones. Más específicamente, las células adecuadas para uso en el biorreactor, en el módulo y en el sistema de la invención se seleccionan del grupo, pero sin limitarse a él, que consiste en células madre embrionarias, células madre adultas, células osteoblásticas, células pre-osteoblásticas, condrocitos, células del núcleo pulposo, pre-condrocitos, células progenitoras esqueléticas derivadas de hueso, médula ósea o sangre, incluyendo las células madre, y combinaciones de las mismas. Las células o tejidos son de origen autólogo, alogénico o xenogénico en relación con el receptor de un implante formadas por las funciones de cultivo celular y de ingeniería de tejidos de la invención.
- 20 Según otro aspecto de la invención, se encuentra un implante de tejido producido dentro de un biorreactor de la presente invención.
- Según otro aspecto más de la presente invención, se encuentra un implante de tejido producido por el sistema de ingeniería de tejidos de la presente invención.
- 30 Se describe en la presente memoria, un constructo implantable de ingeniería de tejidos para la reparación de un traumatismo óseo en donde el implante comprende un andamiaje poroso de un biomaterial óseo en combinación con células óseas activas y una matriz mineralizada formada por ingeniería de tejidos.
- Se describe en la presente memoria, un implante de ingeniería de tejidos que comprende:
- una zona de cartílago que comprende un cartílago de ingeniería de tejidos que está desprovisto de cualquier andamio a base de minerales;
- 35 - una zona de biomaterial óseo que comprende un andamio poroso; y
- una zona interfacial entre dicha zona de cartílago y dicha zona de biomaterial óseo.
- La zona de cartílago promueve la integración lateral con el cartílago del hospedante, mientras que la zona de biomaterial del hueso promueve la integración lateral y vertical con la placa de hueso subcondral cuando se implanta *in vivo*. La zona interfacial proporciona la unión estructural entre la zona del cartílago y la zona del biomaterial óseo.
- 40 La zona de cartílago puede incorporar adicionalmente un andamio no mineral secundario que ayuda a la formación de cartílago por ingeniería de tejidos y permite el desarrollo de un perfil de superficie conformada manteniendo las características anatómicas particulares presentes en el sitio de implantación.
- Se describe en la presente memoria un método para digerir una biopsia de tejido, comprendiendo el método;
- cargar una biopsia de tejido dentro de un biorreactor conectado con un sistema de reservorio y flujo de medios, teniendo dicho biorreactor uno o más sensores para detectar las condiciones fisiológicas dentro de dicho biorreactor hasta un microprocesador
- 45 - proporcionar enzimas de digestión de tejidos; y
- monitorizar y mantener las condiciones adecuadas de digestión dentro de dicho biorreactor durante un período de tiempo suficiente para un nivel deseado de digestión de tejido.
- 50 Se describe en la presente memoria un método para la proliferación de células, comprendiendo dicho método;

- sembrar células en un sustrato o andamio de proliferación sostenido dentro de un biorreactor conectado con un sistema de reservorio y flujo de medios, teniendo dicho biorreactor uno o más sensores para detectar las condiciones fisiológicas dentro de dicho biorreactor hasta un microprocesador; y
- 5
- monitorizar y mantener las condiciones de cultivo adecuadas dentro de dicho biorreactor durante un período de tiempo suficiente para un nivel deseado de proliferación celular.
- Se describe en la presente memoria un método para la diferenciación de células, comprendiendo dicho método;
- sembrar células sobre un sustrato o andamio de diferenciación sostenido dentro de un biorreactor conectado con un sistema de reservorio y flujo de medios, teniendo dicho biorreactor uno o más sensores para detectar las condiciones fisiológicas dentro de dicho biorreactor hasta un microprocesador; y
- 10
- monitorizar y mantener las condiciones de cultivo adecuadas dentro de dicho biorreactor durante un período de tiempo suficiente para un nivel deseado de diferenciación celular.
- Se describe en la presente memoria un método para digerir una biopsia de tejido para proporcionar células primarias, incluyendo células precursoras tales como células madre, y después proliferar y diferenciar las células para permitir la formación de un implante de tejido, comprendiendo el método;
- 15
- cargar una biopsia de tejido dentro de un biorreactor conectado con un sistema de reservorio y flujo de medios, teniendo dicho biorreactor uno o más sensores para detectar y transmitir las condiciones fisiológicas dentro de dicho biorreactor a un microprocesador;
- proporcionar enzimas de digestión de tejidos;
- 20
- monitorizar y mantener las condiciones de digestión adecuadas dentro de dicho biorreactor durante un período de tiempo suficiente para obtener células desasociadas;
- sembrar las células desasociadas sobre un sustrato o andamio de proliferación sostenido dentro de un biorreactor conectado con un sistema de reservorio y flujo de medios, teniendo dicho biorreactor uno o más sensores para detectar las condiciones fisiológicas dentro de dicho biorreactor hasta un microprocesador;
- 25
- monitorizar y mantener las condiciones de cultivo adecuadas dentro de dicho biorreactor durante un período de tiempo suficiente para obtener el nivel deseado de proliferación y expansión celular;
- liberar las células expandidas del sustrato o andamio de proliferación;
- sembrar las células expandidas sobre un sustrato o andamio de diferenciación sostenido dentro de un biorreactor conectado con un sistema de reservorio y flujo de medios, teniendo dicho biorreactor uno o más sensores para detectar y transmitir las condiciones fisiológicas dentro de dicho biorreactor a un microprocesador; y
- 30
- monitorizar y mantener las condiciones de cultivo adecuadas dentro de dicho biorreactor durante un período de tiempo suficiente para obtener un implante de tejido.
- Se describe en la presente memoria un método para proporcionar un implante esquelético, comprendiendo el método;
- 35
- sembrar células osteogénicas y/u osteoprogenitoras sobre un andamio poroso de un biomaterial óseo sostenido dentro de un biorreactor conectado con un sistema de reservorio y flujo de medios, teniendo dicho biorreactor uno o más sensores para detectar las condiciones fisiológicas dentro de dicho biorreactor hasta un microprocesador; y
- monitorizar y mantener las condiciones adecuadas dentro de dicho biorreactor durante un período de tiempo suficiente para permitir que las células osteogénicas y/u osteoprogenitoras proliferen y/o se diferencien a lo largo del andamio para proporcionar un implante de tejido para aplicaciones ortopédicas.
- 40
- Se describe en la presente memoria un método para proporcionar un implante de cartílago, comprendiendo el método;
- sembrar células condrogénicas y/o condroprogenitoras sobre un andamio poroso de un biomaterial sostenido dentro de un biorreactor conectado con un sistema de reservorio y flujo de medios, teniendo dicho biorreactor uno o más sensores para detectar las condiciones fisiológicas dentro de dicho biorreactor hasta un microprocesador; y
- 45
- monitorizar y mantener las condiciones adecuadas dentro de dicho biorreactor durante un período de tiempo suficiente para permitir que las células condrogénicas y/o condroprogenitoras proliferen y/o se diferencien a lo largo del andamio para proporcionar un implante de cartílago.
- Se describe en la presente memoria un método para el lavado de células, que comprende:
- cargar una suspensión celular que contiene uno o más productos químicos no deseados en una cámara;

- recircular de manera continua la suspensión celular desde la cámara a través de un módulo de filtración de flujo cruzado que comprende una membrana impermeable a dichas células pero permeable a dichos productos químicos no deseados para proporcionar una suspensión de células lavadas; y

- recoger la suspensión de células lavadas.

5 Se describe en la presente memoria un método para el enriquecimiento de células, que comprende:

- cargar una suspensión celular que contiene un volumen excesivo de suspensión celular en una cámara;

- recircular de manera continua la suspensión celular desde la cámara a través de un módulo de filtración de flujo cruzado que comprende una membrana impermeable a las células, pero que permite que el exceso de volumen de la suspensión celular sea separado y recogido.

10 Se describe en la presente memoria un método para proporcionar un implante para restablecer el núcleo interno de un disco espinal, comprendiendo el método;

- sembrar células del núcleo pulposo dentro de un andamio, un andamio poroso de un biomaterial sostenido dentro de un biorreactor conectado con un sistema de reservorio y flujo de medios, teniendo dicho biorreactor uno o más sensores para detectar las condiciones fisiológicas dentro de dicho biorreactor hasta un microprocesador; y

15 - monitorizar y mantener las condiciones adecuadas dentro de dicho biorreactor durante un período de tiempo suficiente para permitir la proliferación y/o la diferenciación de las células del núcleo pulposo y la expresión de componentes de la matriz extracelular característicos del núcleo pulposo.

Se describe en la presente memoria un método para la preparación de muestras para evaluación de la calidad para uso en ingeniería de tejidos clínica, comprendiendo dicho método;

20 - preparación paralela de implantes primarios y secundarios utilizando el sistema de la invención como se describe en la presente memoria, donde el implante primario es para implantación y uno o más implantes secundarios son para fines de análisis para inferir el calibre del implante primario.

En varias realizaciones el sistema de ingeniería de tejidos descrito en la presente memoria está bajo el control de uno o más microprocesadores que pueden estar preprogramados para que el usuario pueda seleccionar un tipo específico de entorno (o secuencia de entornos) dentro del biorreactor, tal como la digestión de tejidos, proliferación celular, diferenciación celular y/o formación de constructos de tejido. Esto elimina la intervención del operador y reduce la posibilidad de contaminación involuntaria.

25 El sistema de ingeniería de tejidos de la invención se puede proporcionar como un "kit". De esta manera, el dispositivo, el módulo o módulos de ingeniería de tejidos, el biorreactor o biorreactores y diferentes componentes de los mismos pueden ser empaquetados y vendidos juntos acompañados de instrucciones y técnicas de control de calidad.

30 El sistema de la presente invención es ideal para uso clínico en hospitales y, en particular, en ámbitos quirúrgicos en los que, debido a un traumatismo y/o una enfermedad, se desea un implante obtenido por ingeniería de tejidos. Utilizando el presente sistema, los constructos implantables obtenidos por ingeniería de tejidos se pueden preparar de manera segura a partir de tejido autólogo obtenido mediante biopsia del paciente, células alogénicas o células xenogénicas. Las especificaciones de tales constructos de ingeniería de tejidos implantables se pueden adaptar al tipo, tamaño y condición del sitio de implantación. Además, el implante generado por el presente sistema contiene células activas que promueven la integración con el hospedante, mejorando así la recuperación del paciente.

35 En la práctica, utilizando un modelo de células autólogas, se puede obtener una biopsia de tejido del paciente y colocarla directamente en el biorreactor presente en el módulo de ingeniería de tejidos mientras está en el quirófano. Se selecciona un diseño de biorreactor específico dependiendo del tipo y tamaño del constructo de tejido deseado. Una vez finalizado el proceso de ingeniería de tejidos, el constructo de tejido producido se puede transportar todavía contenido en el biorreactor estéril al quirófano para volverlo a implantar en el paciente. El sistema es ideal para proporcionar implantes de tejidos autólogos "personalizados" de una manera segura y terapéuticamente eficaz.

40 El sistema y los métodos de la presente invención no se limitan a proporcionar técnicas automatizadas de cultivo celular. El sistema de ingeniería de tejidos descrito se mueve mucho más allá de la expansión celular utilizada en la terapia celular. El sistema de ingeniería de tejidos se puede usar para crear constructos de tejido funcionales donde las células presentes son activas, diferenciadas y expresan ya una matriz extracelular. En consecuencia, los constructos de tejido así producidos tienen un alto estado de desarrollo y, por lo tanto, aceleran la velocidad y mejoran la calidad de la reparación del tejido en el sitio del implante.

45 El sistema de la invención también es adecuado para la investigación farmacológica. Específicamente, el sistema se puede utilizar en el área de desarrollo de fármacos. Se pueden ensayar nuevas moléculas y fármacos potenciales en células y tejidos para determinar los efectos sobre los sucesos celulares y el desarrollo de tejidos. Dichos ensayos se pueden realizar en las células/tejidos propios de un paciente para evaluar y posiblemente evitar los efectos

secundarios adversos antes de la administración. Alternativamente, se pueden usar líneas celulares o tejidos especializados con el sistema como una herramienta clave en el proceso de descubrimiento de fármacos. El sistema se puede programar para monitorizar y evaluar diversas condiciones fisiológicas de las células/tejidos presentes dentro del biorreactor y, por lo tanto, proporcionar una indicación rápida de los efectos biológicos de un fármaco o molécula seleccionados.

5 El sistema se puede usar también para estudios de investigación y desarrollo donde las técnicas de ingeniería de tejidos convencionales son difíciles de usar y practicar, y/o en condiciones que requieren extensos registros de diagnóstico. Por ejemplo, los estudios en microgravedad que implican la ingeniería de tejidos son difíciles de realizar debido a las propiedades únicas de este entorno. Las técnicas tradicionales de cultivo de células y tejidos simplemente no son viables en este entorno debido a problemas de contención de fluidos y a la ausencia de transporte de células en gravedad. El sistema y los métodos de la invención son fácilmente adaptables al entorno de la microgravedad, ya que el sistema está completamente sellado para evitar la pérdida de fluido y la migración de las células como parte del proceso de ingeniería de tejidos se puede lograr mediante un flujo de fluido controlado.

10 Otras características y ventajas de la presente invención se harán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, ejemplos y dibujos. Sin embargo, se debe entender que la descripción detallada, los ejemplos específicos y los dibujos aunque indican realizaciones de los sistemas y métodos descritos en la presente memoria, se dan a modo de ilustración solamente, ya que diversos cambios y modificaciones dentro del alcance de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de dicha descripción detallada.

### Breve descripción de los dibujos

20 La presente divulgación se comprenderá mejor a partir de la siguiente descripción con referencia a las figuras, en las que:

Figura 1 ilustra una metodología general para la ingeniería de tejidos clínica aplicada al ejemplo de reparación de cartílago utilizando condrocitos autólogos;

Figura 2 muestra un dispositivo integrado de ingeniería de tejidos como se describe en la presente memoria;

25 Figura 3 muestra una realización adicional del dispositivo de ingeniería de tejidos de la Figura 2;

Figura 4 muestra una realización adicional del dispositivo de ingeniería de tejidos de la Figura 2;

Figura 5 muestra una vista en corte del dispositivo de ingeniería de tejidos de la Figura 2 que ilustra algunos de los componentes internos y un módulo de ingeniería de tejidos para inserción en el dispositivo;

30 Figura 6 muestra una vista en corte ampliada del dispositivo de ingeniería de tejidos de la Figura 2 que ilustra un módulo de ingeniería de tejidos insertado;

Figura 7 muestra una vista en perspectiva ampliada del módulo de ingeniería de tejidos y la interfaz con los componentes de la carcasa del dispositivo;

Figura 7 (a) muestra una vista en perspectiva ampliada del biorreactor y de la unidad de la bomba;

Figura 7 (b) muestra una vista en perspectiva ampliada de la unidad de la bomba y el tubo de la bomba asociado;

35 Figura 8 muestra una vista en perspectiva del lado inverso del módulo de ingeniería de tejidos de la Figura 7 y la configuración interna de la placa de flujo que se une al mismo;

Figura 9 muestra una vista en perspectiva ampliada de los componentes de la mezcla y microcarga asociados con el diseño del biorreactor instrumentado;

Figura 10 muestra el esquema de flujo de fluidos de la ingeniería de tejidos básica;

40 Figura 11 muestra una realización adicional del esquema de flujo de fluido de la ingeniería de tejidos básica.

Figura 12 muestra biorreactor alternativo, sustrato o andamio de proliferación, andamio de diferenciación y diseños de monitorización del proceso, según sea aplicable a diferentes escenarios de ingeniería de tejidos;

Figura 13 muestra una vista en perspectiva ampliada del biorreactor del módulo de ingeniería de tejidos, que ilustra la configuración interna del biorreactor y la trayectoria de flujo de los fluidos;

45 Figura 14 muestra una realización adicional del biorreactor del módulo de ingeniería de tejidos, que ilustra la configuración interna del biorreactor;

Figura 15 muestra un diseño de biorreactor giratorio;

Figura 16 muestra la realización de muestreo estéril del módulo de ingeniería de tejidos;

Figura 17 muestra una realización adicional del esquema de flujo de fluido de la ingeniería de tejidos;

Figura 18 muestra otra realización más del esquema de flujo de fluido de ingeniería de tejidos; y

Figura 19 muestra un diseño de biorreactor adecuado para la digestión de tejidos y la recogida de células;

Figura 20 muestra un diseño de biorreactor adecuado para la proliferación celular;

5 Figura 21 muestra un diseño de biorreactor adecuado para la diferenciación celular y la formación de constructos de tejido;

Figura 22 muestra otra realización más del esquema de flujo de fluido de ingeniería de tejidos; y

Figura 23 muestra una realización adicional del módulo de ingeniería de tejidos con biorreactores separados para la digestión de tejidos/recogida de células, proliferación celular y diferenciación de células/formación de tejidos.

## 10 Descripción detallada

La presente invención se dirige a un dispositivo de ingeniería de tejidos integrado y automatizado para el procesamiento *ex vivo* de células, particularmente células autólogas, para permitir la proliferación celular, la diferenciación celular y la formación de tejido de una manera eficiente y consistente que requiere una intervención humana mínima. Los constructos de tejido desarrollados dentro del dispositivo pueden ser integrados en un hospedante para ayudar en los procedimientos de reconstrucción del tejido y la posterior recuperación del paciente. Además, la invención proporciona métodos automatizados para la ingeniería de tejidos utilizando una variedad de células de una serie de fuentes diferentes incluyendo células autólogas obtenidas mediante biopsia del paciente, células alogénicas o células xenogénicas. Además, las células pueden ser células precursoras, células primarias, células de una línea celular inmortal y combinaciones de las mismas.

15 La metodología general y el principio para la ingeniería de tejidos clínica que incorpora el sistema de ingeniería de tejidos y los métodos de la presente divulgación se ilustran en la Figura 1, utilizando ingeniería de tejido de cartílago autólogo como un ejemplo representativo. En tal ejemplo, las células (esto es, los condrocitos) se obtienen de una biopsia quirúrgica de un paciente y se siembran manual o automáticamente en un sustrato o andamio adecuado (esto es, un soporte de Skelite™). Los condrocitos y el soporte están presentes dentro de la porción del biorreactor de un módulo automatizado de ingeniería de tejidos, formando el módulo parte de una estación de base clínica del sistema de ingeniería de tejidos. Un microprocesador central está presente dentro del sistema de ingeniería de tejidos y controla y personaliza el ambiente interno del biorreactor, y por lo tanto facilita el crecimiento del tejido en él, dando como resultado la estimulación del crecimiento celular dentro y sobre el soporte para generar un implante. Los sensores dentro del biorreactor proporcionan información al microprocesador para asegurar que las células se siembran, se expanden y se diferencian de una manera deseada y controlada para proporcionar un implante de tejido autólogo. Una vez que se genera el implante, se retira del biorreactor para la implantación quirúrgica en el paciente. El presente sistema proporciona una forma ventajosa de proporcionar implantes autólogos por ingeniería de tejidos de una manera estéril, segura, conveniente y eficaz. Además, la capacidad de preparar implantes por ingeniería de tejidos en un ámbito clínico permite una considerable flexibilidad en las localizaciones para llevar a cabo el proceso de ingeniería de tejidos. Aunque el sistema se puede utilizar en una localización centralizada, el diseño y el funcionamiento del sistema permiten el uso clínico en centros regionales. Dicha disponibilidad generalizada excluye el transporte de material biológico hacia y desde las instalaciones centralizadas de procesamiento de células/tejidos, lo que mejora la rentabilidad y la eficiencia del proceso de ingeniería de tejidos a la vez que se evita el transporte, el seguimiento y las complicaciones reglamentarias.

20 De acuerdo con una realización un sistema de ingeniería de tejidos como se muestra en la Figura 2 y en general se indica con el número de referencia 100. El sistema 100 (se puede denominar alternativamente como un dispositivo) comprende una carcasa 102 que tiene una ranura 104 de inserción para recibir un módulo de ingeniería de tejidos. La ranura 104 de inserción tiene una puerta 106 móvil y un mecanismo 108 de cierre. Se proporciona una interfaz 110 de usuario, tal como una pantalla táctil, un teclado o una combinación de ambos para controlar la operación del sistema y para mostrar el estado del sistema. Está presente un sistema 112 de almacenamiento de datos que permite el registro de información a través de una variedad de medios conocidos por los expertos en la técnica (esto es, ZIP, CDROM, disquete, flashcard). Un enlace 114 de ordenador/comunicaciones proporciona la capacidad de cargar nuevo software, modificar los parámetros de control utilizando un ordenador externo, descargar los datos, así como solucionar problemas y probar el dispositivo. Este enlace permite también que el sistema se conecte a los sistemas de información electrónicos presentes en la clínica. El sistema 100 se alimenta con una entrada 116 de energía. La Figura 3 muestra una realización adicional del sistema 100 que tiene varias puertas 106 de compartimento para acomodar varios módulos de ingeniería de tejidos.

La Figura 4 muestra una realización adicional del sistema 100 que tiene puertas 106 de compartimento orientadas de manera horizontal para permitir la orientación preferencial del módulo de ingeniería de tejidos con respecto al vector de gravedad.

La Figura 5 muestra la configuración interna del sistema 100 representado en las figuras 2 y 3 con la orientación vertical de las puertas de compartimento para la inserción vertical de un módulo de ingeniería de tejidos. Se muestra un módulo 118 de ingeniería de tejidos para inserción dentro de la ranura 104 de inserción de la puerta 106 de módulos. El módulo 118 de ingeniería de tejidos se desliza en la carcasa 102 del sistema a través de un sistema 120 de raíl como guía. Después de la inserción, el módulo 118 se acopla con una o más unidades de bombas 122 (esto es, peristálticas, de pistón, diafragma o rotativas), conectores 124 eléctricos (esto es, DIN, AMP, PCB, enchufe de tablero) y actuadores 126 de válvulas (esto es, servomotor, impulsión lineal, actuador lineal). Se puede contemplar cualquier sistema de guía adecuado para permitir que el módulo se inserte adecuadamente en el sistema, tal como lo entiende un experto en la técnica.

Como se ve mejor en la Figura 6, cuando se inserta el módulo 118 de ingeniería de tejidos en la carcasa 102, una serie de actuadores 126 de válvulas se interconectan con las válvulas (que se muestran con más detalle en las figuras 7 y 7a) sobre el módulo para proporcionar control de flujo. Los conectores 124 eléctricos proporcionan conexión eléctrica entre el módulo 118 y una unidad central de microprocesamiento (CPU) 128 mediante un panel 130 posterior electrónico. La CPU 128 controla la secuencia operativa, el transporte de fluidos y gases, la gestión de datos de proceso, la monitorización del estado del sistema, la interfaz de usuario y el puerto de comunicación de datos externos. La CPU 128 proporciona control a través de enlaces eléctricos con componentes eléctricos activos y pasivos presentes en el panel posterior 130 y cada uno de los módulos 118 de ingeniería de tejidos insertados.

Los sensores 132 de temperatura (esto es, termopar, RTD o termistor), los sensores 134 de gases (esto es, O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>) y una unidad 136 de control de ambiente (ECU) se controlan por la CPU 128 para mantener el ambiente (esto es, la temperatura y la atmósfera de gas) dentro de la carcasa 102 utilizando métodos estándar conocidos por los expertos en la técnica. El ambiente se puede ajustar para cumplir los requisitos del proceso de ingeniería de tejidos, incluyendo el almacenamiento de reactivos a temperatura de refrigeración (esto es, 4°C), la simulación de la temperatura corporal nominal (esto es, 37°C) y la disponibilidad de mezclas gaseosas para transporte dentro y fuera del módulo 118 en el caso de que el módulo esté equipado con componentes de intercambio de gases (esto es, membranas). Las condiciones gaseosas son monitorizadas por los sensores 134 de gases localizados dentro de la carcasa 102 y los datos se envían a la CPU 128 a través del panel 130 posterior electrónico. La entrada de gases a la ECU puede ser a través de la entrada 140 de suministro de gases provista dentro de la carcasa 102 configurada con accesorios estándar. En otras realizaciones, los gases pueden alojarse dentro de la ECU. Los gases para uso dentro del dispositivo incluyen, pero no se limitan a oxígeno, dióxido de carbono, nitrógeno y mezclas de los mismos. Para contener adecuadamente dichos gases dentro de la carcasa 102, la puerta 106 del módulo está configurada para proporcionar un cierre hermético cuando está cerrada. La carcasa 102 está aislada con material 142 aislante tal como espuma de poliestireno, aerogel, fibra de vidrio y similares para permitir una regulación eficiente de las temperaturas internas (esto es, de 4°C a 37°C).

Aunque generalmente se muestra que los sistemas de ingeniería de tejidos descritos en la presente memoria comprenden una carcasa con forma de caja, los expertos en la técnica entienden que la carcasa puede tener diferentes configuraciones siempre que pueda alojar a los componentes como se describe en la presente memoria. Por ejemplo, esto incluye pero no se limita a configuraciones abiertas que pueden no requerir partes superiores ni/o laterales.

El módulo 118 de ingeniería de tejidos se ilustra con más detalle en las figuras 7-9. El módulo 118 de ingeniería de tejidos comprende una columna 200 estructural rígida a la que se fija un biorreactor 202. El biorreactor 202 comprende una carcasa de biorreactor que tiene una tapa 204 y puede ser personalizado con respecto al sustrato o andamio o a lo sustratos o andamios que contiene para permitir la digestión de tejidos, el cultivo celular, la proliferación celular, la diferenciación celular, la formación de implantes tisulares y combinaciones de los mismos. La tapa del biorreactor puede ser desmontable o, como alternativa, puede estar integrada en la carcasa del biorreactor. El biorreactor 202 puede ser por separado desmontable y desechable con respecto a la columna 200 estructural. Para permitir tal desmontaje, el biorreactor 202 y la columna 200 estructural pueden usar accesorios de desconexión de fluido que incluyen la provisión para el autosellado de las líneas de entrada y salida para evitar la pérdida de fluidos y para prevenir la contaminación de los contenidos del biorreactor. El módulo de ingeniería de tejidos completo se puede considerar desechable después de completar una secuencia de ingeniería de tejidos, ya que esta práctica evita la contaminación que se deriva de un uso anterior. Alternativamente, sólo componentes seleccionados del módulo 118 se pueden considerar desechables debido al contacto con fluidos, dejando los componentes no propensos a la contaminación disponibles para su reutilización.

Como se ve en las figuras 7, 7a y 7b, un sistema 206 de contención de fluidos está fijo sobre la columna 200 estructural del módulo 118 de ingeniería de tejidos. El sistema 206 de contención de fluidos se compone de una serie estéril de reservorios 208 flexibles y una tubería 210 flexible para suministrar y recuperar tipos de tejido y fluidos de cultivo celular y productos farmacéuticos hacia y desde el biorreactor 202. Los reservorios 208 pueden ser de configuración y número variables según sea necesario y pueden contener diferentes tipos de medios de cultivo de células y tejidos, factores de crecimiento, agentes farmacéuticos y pueden contener también residuos de medios y/o de muestras de medios procedentes del biorreactor 202. Los fluidos se cargan o se eliminan del sistema 206 de contención de fluidos a través de una serie de puertos 212 de acceso de fluidos. La tubería 210 está presente para proporcionar una conexión de fluido entre los diversos reservorios 208 y los componentes de control de fluido, tales como las válvulas 214 de control de flujo de fluido. Las válvulas 214 de control de flujo de fluido se abren y se cierran

por los actuadores 126 de válvulas. De manera similar, la unidad de bomba 122 interactúa con los componentes de bomba desechables presentes en el módulo. Estos componentes de la bomba pueden ser pistones, diafragmas, elementos rotativos o tubos 218 peristálticos, siempre que el funcionamiento de estos componentes no genere condiciones extremas, tales como un esfuerzo excesivo de cizallamiento, que comprometan la viabilidad celular durante la transferencia de las suspensiones celulares. La unidad de bomba 122 y los actuadores 126 de válvulas residen dentro de la carcasa 102. Alternativamente, los actuadores y la unidad de bomba pueden formar parte del módulo de ingeniería de tejidos, sin embargo, esto puede dar como resultado el desecho de estos componentes después del uso por el paciente. El fluido se transfiere fuera de los reservorios 208 por la acción programada de la unidad de bomba 122 sobre la tubería 218 de la bomba. El fluido se desplaza desde un reservorio 208 de fluido flexible hasta una válvula 214 de fluido a través de la tubería 210. Una placa 220 de flujo de fluido (como se muestra en la Figura 8) dirige el flujo de fluido entre las diferentes válvulas 214 de control de flujo y la tubería 218 de bomba de la unidad 122 de bomba. El fluido es devuelto a un reservorio 208 seleccionado vacío para su almacenamiento. Una placa 222 de circuito impreso (PCB) flexible proporciona la interfaz electrónica para los componentes electrónicos (esto es, los sensores) presentes sobre la columna 200 estructural y/o el biorreactor 202. En el caso de que un sensor indique que un parámetro monitorizado (por ejemplo, pH) está fuera de niveles aceptables, la CPU desencadena una intervención de control, tal como la sustitución de los medios dentro del biorreactor.

El módulo de ingeniería de tejidos puede incluir opcionalmente un microprocesador 224 para permitir el procesamiento de datos y el almacenamiento de datos directamente en el módulo. Esta información se puede transferir a la CPU 128 central mientras el módulo se inserta en la carcasa 102 y se retiene en la memoria electrónica para un acceso posterior una vez que se retira el módulo. Además de los datos almacenados mediante el microprocesador o el chip de memoria residente en el módulo de ingeniería de tejidos, el módulo puede incluir también opcionalmente un código de barras 226, una banda magnética 228, una memoria electrónica (no se muestra) y/o una etiqueta 230 de identificación para facilitar el seguimiento administrativo dentro de la clínica.

Como se ve en la Figura 8, la placa 220 de flujo de fluido está asegurada a la columna 200 estructural del módulo 118 de ingeniería de tejidos. La técnica para la unión de la placa de flujo de fluido puede ser, pero no se limita a, un contacto a presión, ajuste a presión, soldadura ultrasónica, unión por disolvente y similares, reconociendo que la técnica adoptada debe permitir el sellado del conjunto para evitar la pérdida de fluidos y prevenir la contaminación. Como se muestra en la vista desmontada en la Figura 8a, la placa 220 de flujo de fluido tiene una ruta 232 de fluido integral para proporcionar un medio para dirigir el flujo asociado con la actuación de las válvulas 214 de fluido. Se pueden acomodar nuevas rutas de flujo a través de revisiones de la ruta presente en la placa 220 de flujo. En una realización, la placa 220 de fluido puede estar formada integralmente en la columna 200 estructural para formar un único componente. Se incluye una cámara 234 de calentamiento y mezcla de fluido para asegurar que los fluidos que se dirigen al biorreactor están a la temperatura correcta y se mezclan adecuadamente para no interrumpir los procesos biológicos en curso en el biorreactor. Además, un elemento 236 termoelectrico está presente en el módulo 118 de ingeniería de tejidos para variar la temperatura dentro del biorreactor 202 en comparación con la temperatura operativa del módulo, como se define por la operación de la ECU 136. Tal cambio de temperatura puede ser necesario para simular condiciones fisiológicas nominales dentro del biorreactor, mientras que los componentes restantes del módulo de ingeniería de tejidos, particularmente los reactivos y/o las muestras, están a una temperatura reducida (esto es, refrigeración) para mantener la viabilidad física, química y/o biológica. La energía y el control del elemento termoelectrico se realizan mediante la CPU 128. Además de los sensores presentes en el biorreactor, un sensor 238 presente en el módulo de ingeniería de tejidos proporciona información a la CPU 128. El sensor y las conexiones termoelectricas se realizan a través del cableado 240 eléctrico y el conector 124.

La Figura 9 muestra los aspectos de mezcla y microcarga del módulo 118 de ingeniería de tejidos. El biorreactor 202 tiene un impulsor 260 de mezcla conectado operativamente con un actuador 262 de mezcla y con el diafragma 264 de mezcla. El diafragma de mezcla se incorpora como parte del biorreactor 202 o de la tapa 204 del biorreactor, como se muestra. En funcionamiento, el impulsor 260 de mezcla en combinación con el actuador 262 de mezcla proporciona la traslación o la pulsación del diafragma de mezcla para efectuar la mezcla controlada de los contenidos del biorreactor 202. Idealmente, la naturaleza de la mezcla es tal que evite un alto cizallamiento del fluido que podría comprometer la integridad física de las células presentes dentro del biorreactor. Para ciertos protocolos de ingeniería de tejidos, los niveles moderados de cizallamiento del fluido son realmente beneficiosos para el desarrollo satisfactorio de constructos de tejido. En adición a los componentes de la mezcla, están presentes un impulsor 266 de impacto y un actuador 268 de impacto. Estos componentes sirven para aplicar un impacto controlado al conjunto del biorreactor a la conclusión de la secuencia de proliferación para ayudar a la liberación de células desde un sustrato o andamio de proliferación residente dentro del biorreactor. También se proporciona un impulsor 270 de microcarga en conexión operable con un actuador 272 de microcarga y un diafragma 274 de microcarga. El diafragma 274 de microcarga se incorpora como parte del biorreactor 202 o de la tapa 204 del biorreactor, como se muestra. La localización y orientación del diafragma de microcarga es tal que permite un contacto íntimo con el sustrato o andamio y cualquier célula o tejido asociado presentes en el biorreactor 202. Es sabido que la aplicación de microcargas es ventajosa para ciertos protocolos de ingeniería de tejidos. El impulsor 260 de mezcla, el impulsor 266 de impacto y el impulsor 270 de microcarga pueden ser cualquiera de una serie de dispositivos electromecánicos tales como solenoides, transmisores lineales, transmisores rotacionales o componentes piezoeléctricos. Además, es posible que el impulsor 260 de mezcla, el impulsor 266 de impacto, y el impulsor 270 de microcarga, y los actuadores relacionados estén montados sobre la carcasa 200. Alternativamente,

los impulsores y actuadores se pueden montar sobre el módulo de ingeniería de tejidos o sobre el biorreactor, siempre que el diseño de los impulsores sea consistente con la naturaleza desechable del módulo de ingeniería de tejidos. Además de la provisión de estimulación mecánica, el biorreactor también puede estar configurado para introducir estimulación eléctrica y/o química del constructo de tejido. En particular, se pueden generar campos eléctricos en la región del biorreactor para mejorar el transporte celular y/o la formación de tejido. Los expertos en la técnica conocen métodos de generación de campos eléctricos que incluyen, pero no se limitan a la provisión de bobinas eléctricas.

La Figura 10 ilustra un esquema de flujo de fluido básico para el módulo 118 de ingeniería de tejidos en el que hay una única cámara de cultivo de células o tejidos presente dentro del biorreactor 202 (hágase referencia a las descripciones de las figuras 12 y 17 para obtener más información sobre los biorreactores de múltiples cámaras). La ruta de flujo une el biorreactor 202 a los reservorios 208 que suministran fluido y recogen residuos. Los puertos 212 de acceso de fluido se pueden utilizar para cargar reactivos o separar muestras o fluido de desecho. El flujo se genera mediante la operación de la unidad de bomba 122 con la dirección del flujo definida por la actuación de las válvulas 214 de control de flujo específicas. La perfusión al biorreactor puede ser continua o pulsátil, siempre que el flujo asociado no dé lugar a un alto cizallamiento del fluido en regiones que contienen células, ya que tales condiciones podrían dañar a las células o a un constructo de tejido emergente. Se proporciona un bucle 280 de recirculación para permitir que los contenidos de fluido del biorreactor sean monitorizados o modificados por componentes externos, tales como una membrana 282 de intercambio de gases en línea, sin necesidad de suministro de nuevo fluido desde los reservorios 208 de fluido. Los componentes del módulo 118 de ingeniería de tejidos dedicado al almacenamiento de fluidos (esto es, los reservorios 208), se mantienen refrigerados a aproximadamente 4°C para facilitar el almacenamiento de fluidos que de otro modo se degradarían a las elevadas temperaturas utilizadas para simular la temperatura corporal (esto es, 37°C). Según una rutina preprogramada, la CPU 128 controla el funcionamiento de la válvula o válvulas 214 de fluido para permitir que el fluido almacenado en un reservorio 208 sea suministrado a través de la unidad de bomba 122 a una cámara 234 de calentamiento y mezcla antes de entrar en la cámara 300 del biorreactor (mostrado en detalle en las figuras 13, 14 y 15). Los fluidos se suministran al biorreactor a través del puerto 302 de entrada y se eliminan a través del puerto 304 de salida. Para simular las temperaturas corporales normales para un rendimiento óptimo del cultivo de células y tejidos, el biorreactor 202, la unidad 122 de bomba y la cámara 234 de calentamiento y mezcla se mantienen a aproximadamente 37°C mediante la operación de un elemento 236 termoeléctrico. Será obvio para los expertos en la técnica que se pueden usar dispositivos de regulación térmica alternativos para obtener los perfiles térmicos deseados para el módulo 118 de ingeniería de tejidos.

La Figura 11 ilustra una variación del esquema básico de flujo de fluidos donde las válvulas de control de flujo de fluidos están sustituidas por múltiples unidades 122 de bombeo. Esta configuración proporciona una redundancia operativa mejorada y un número de componentes reducido. El funcionamiento de un sistema de este tipo requiere que cualquier unidad de bomba inactiva evite el flujo de transferencia no regulado, ya que tal aparición podría comprometer el suministro controlado de fluidos.

Las figuras 12a-12d ilustran varias configuraciones de biorreactores y formatos alternativos para los sustratos y andamios utilizados para las etapas de proliferación y diferenciación implicadas en la operación del sistema de ingeniería de tejidos. La Figura 12a muestra una serie de diseños de biorreactores intercambiables que abordan diferentes escenarios de bioprocesamiento. El escenario de Tipo I es indicativo de una única cámara 300 básica dentro de un biorreactor 202 que aloja un andamio o sustrato 310 de proliferación, o un andamio o sustrato de diferenciación (no se muestra) y es idealmente adecuada para la proliferación o la diferenciación. Las células se siembran manualmente sobre el andamio 310 o se suministran automáticamente a través de la ruta de fluido del módulo de ingeniería de tejidos.

El escenario de Tipo II incluye un biorreactor multi-cámaras que permite el uso de un andamio 310 (o sustrato) para la proliferación de la población celular y un andamio 312 de diferenciación implantable que promueve la formación de un constructo de tejido. La cámara 300 de cultivo/proliferación está conectada a la cámara 306 de diferenciación/formación de tejido a través de un embudo 314. El embudo sirve para canalizar las células liberadas desde el andamio 310 de proliferación hasta el andamio 312 de diferenciación implantable. El uso de un filtro 316 en varias localizaciones dentro del biorreactor sirve para regular el tamaño de las células o agregados celulares que pueden pasar libremente de una cámara a la siguiente. Un filtro 316a está presente aguas arriba del andamio de proliferación con el fin de regular la población de células entrantes para la etapa de expansión celular. Otro filtro 316b está presente aguas arriba del andamio de diferenciación nuevamente para controlar la población de células que entra en esta etapa de la secuencia de ingeniería de tejidos. Además, hay un filtro adicional 316c sobre el puerto 304 de salida para prevenir la pérdida de células de la cámara de diferenciación/formación de tejido durante las operaciones que implican la transferencia de fluido a través del biorreactor. El filtro 316 puede ser una membrana o malla filtrante o un material de filtración de tipo similar, como es conocido por los expertos en la técnica.

El escenario de Tipo III combina la digestión de tejido con la subsiguiente proliferación, diferenciación y formación de constructos de tejido. En este escenario, una biopsia 320 de tejido se carga en una cámara 322 de digestión presente dentro del biorreactor 202. La digestión de la biopsia de tejido se produce a través del suministro de enzimas de digestión al biorreactor desde uno de los reservorios 208 de fluido presentes en el módulo de ingeniería de tejidos. Las células desasociadas salen de la cámara 322 de digestión bajo la influencia de la sedimentación por

5 gravedad y/o el flujo de fluido a través de la cámara 300 de cultivo/proliferación, y después se recogen en el andamio 310 de proliferación. La transferencia de agregados de tejido fuera de la cámara 322 de digestión queda excluida por la presencia de una membrana/malla 316a de filtro en la trayectoria de flujo entre la cámara 322 de digestión y la cámara 300 de cultivo/proliferación. Después de la proliferación, las células se liberan y se transfieren al andamio 312 de diferenciación implantable a través del embudo 314 de células. Nuevamente, los filtros de membrana/malla están presentes tanto aguas arriba 316b como aguas abajo 316c del andamio 312 de diferenciación implantable para asegurar que la población celular correcta está sembrada sobre el andamio y que las células no se pierden inadvertidamente en desechos durante las operaciones de transferencia de fluidos.

10 En los escenarios anteriores, son posibles varias configuraciones del sustrato o andamio 310 de proliferación, como se ilustra, por ejemplo, en la Figura 12b. Por ejemplo, una configuración es un andamio 310a poroso que tiene un gradiente de poros relativamente uniforme. Un andamio 310b de gradiente de poros es un andamio poroso que tiene un gradiente de poros donde el tamaño de los poros disminuye a medida que las células se desplazan a través del andamio. Esto promueve una distribución más homogénea de las células en todo el andamio al terminar el proceso de siembra de las células. Se puede usar un andamio 310c con gradiente de poros con orientación invertida. Alternativamente, se puede usar un andamio 310d de filtro de fibra que es una matriz fibrosa típica de compuestos orgánicos tales como colágeno. También es posible utilizar una suspensión contenida de microportadores (p. ej., Cytodex™) como sustrato de proliferación. Además, el biorreactor puede tener una sonda 324 óptica (se muestra junto con el andamio 310a poroso) sostenida por la CPU 128 para permitir la inspección del procedimiento de siembra de células que tiene lugar dentro del andamio de proliferación y para evaluar además los sucesos de proliferación, particularmente el progreso para obtener una capa de células confluentes.

15 Al igual que con la proliferación, hay una variedad de andamios 312 de diferenciación implantables que se pueden formar en diferente configuración y de diversos materiales (esto es, andamios a base de minerales inorgánicos tales como el fosfato de calcio, andamios de biopolímero orgánico tales como el colágeno, etc.) y emplear en el proceso de ingeniería de tejidos. La Figura 12c ilustra una cámara 306 multizona de diferenciación/formación de tejido que comprende hasta tres andamios 312 de diferenciación implantables, todos los cuales pueden seguir simultáneamente hacia la formación de constructos de tejido. Esto permite la preparación de diferentes tamaños de tejido implantable y el uso de andamios alternativos de diferenciación implantables para evaluar y maximizar el rendimiento del tejido. Por ejemplo, el andamio 312a es un retículo poroso formado a partir de un biomaterial óseo tal como Skelite™ para uso en aplicaciones de cartílago y hueso donde el constructo de tejido requiere un anclaje de tejido duro dentro del hueso. El andamio 312a se puede mejorar aún más mediante el uso de una membrana/malla 326 de andamio que rodea el implante para crear un andamio 312b rodeado de membrana de tal manera que se minimice la pérdida de células fuera del andamio 312a durante el proceso de siembra de células, haciendo así más eficiente el proceso de ingeniería de tejidos. Preferiblemente, la membrana puede rodear solo parcialmente el andamio o alternativamente, rodear más completamente el andamio. Aunque el propósito principal de la membrana/malla 326 de andamio es contener las células sobre y dentro del andamio 312 de diferenciación implantable, la selección cuidadosa de las propiedades de la membrana/malla 326 del andamio tal como entienden los expertos en la técnica permite o limita el paso de entidades moleculares específicas que pueden tener una influencia marcada sobre el proceso de ingeniería de tejidos a nivel celular.

20 Una realización adicional es una porosidad en gradiente y un andamio 312c rodeado por una membrana que combina las ventajas de la membrana/malla 326 del andamio con un gradiente de poros. El gradiente está configurado para hacer deliberadamente que las células se recojan en la superficie superior con sólo una propagación mínima en el andamio. Un grado de porosidad en la superficie se considera ventajoso para la estabilidad del tejido y para el suministro de nutrientes al tejido en desarrollo a través de la superficie del andamio. Esta estrategia da como resultado el desarrollo de un constructo de tejido bipolar con distintas zonas estratificadas. La zona superior se compone esencialmente de tejido *de novo*. La zona inferior está esencialmente libre de células o de tejido y permanece como un andamio poroso abierto. La zona interfacial media representa la transición estructuralmente estable entre el andamio abierto y la capa de tejido *de novo*. Tal constructo de tejido bipolar es ideal para la reparación de defectos focales en el cartílago articular, ya que la capa superior es un cartílago obtenido por ingeniería de tejidos que proporciona una integración lateral con el cartílago del hospedante, mientras que la capa inferior proporciona una integración lateral y axial con el hueso subcondral. La integración de la capa inferior con el hueso subcondral circundante se puede mejorar además por la aplicación de médula ósea al andamio abierto en el momento de la implantación quirúrgica. En las aplicaciones de reparación de cartílago, es importante que el andamio a base de minerales no se extienda a la superficie articular, ya que esto puede comprometer la función de la articulación. Por consiguiente, se puede emplear un andamio secundario no mineral (no se muestra en las figuras) en la zona superior del cartílago *de novo* para ayudar en la formación de constructos de tejido de tamaño suficiente para tratar lesiones grandes de cartílago (esto es, hasta 10 cm<sup>2</sup> de diámetro y 2-3 mm de espesor). Además, el andamio secundario se puede configurar para generar constructos con forma que tienen perfiles de superficie articular que se ajustan más a las características anatómicas particulares presentes en el sitio de implantación. Los materiales candidatos para el andamio secundario son biopolímeros sintéticos (por ejemplo, PGA, PLA) o biopolímeros naturales (por ejemplo, alginato, agarosa, fibrina, colágeno, ácido hialurónico). Estos andamios secundarios pueden estar en la forma de hidrogeles o andamios preformados tridimensionales.

25 Son posibles técnicas alternativas para la preparación de constructos de tejido bipolar dentro del sistema de ingeniería de tejidos. El andamio 312 de diferenciación implantable puede estar parcialmente infiltrado con un

polímero biorreabsorbible que limita la siembra de células a ciertas regiones del andamio. Esto crea una zona preferencial de formación de nuevo tejido durante la preparación del constructo de tejido. Tras la implantación, el polímero se reabsorbe, lo que deja vacíos en el andamio poroso que promueven el anclaje dentro del tejido hospedante. Una configuración adicional implica un andamio implantable con una porosidad relativamente abierta que se posiciona lejos de la salida de la cámara de diferenciación/formación de tejido. Durante la siembra de células, este espacio abierto permite la recogida de células que migran a través del andamio abierto. A medida que las células se acumulan dentro de la cámara de diferenciación/formación de tejido, tanto el espacio abierto como una porción del andamio se infiltran con las células y, por lo tanto, crean una zona preferencial de formación de nuevo tejido. El constructo de tejido resultante comprende una zona de tejido *de novo* que está desprovista del andamio, una zona media de transición o zona interfacial que contiene tanto el tejido *de novo* como el andamio, y una región del andamio poroso que es abierta y esencialmente libre de células o tejido.

La Figura 12d ilustra un esquema de monitorización del biorreactor por el cual los sensores 216 (esto es, temperatura, pH, gases disueltos, etc.) se integran en la tapa 204 del biorreactor 202 para proporcionar información a la CPU 128 del progreso del proceso de ingeniería de tejidos. Además, se puede emplear una cámara 330 CCD para monitorizar las propiedades ópticas del andamio 310 (o sustrato) de proliferación en busca de evidencia de confluencia inminente (por ejemplo, densidad óptica y/o dispersión de la luz en función de la densidad celular) de tal manera que la liberación celular es cronometrada para maximizar el rendimiento celular a partir de la etapa de proliferación.

La Figura 13 muestra mejor la trayectoria de flujo y la circulación de fluido dentro del biorreactor 202. Se muestra que el biorreactor 202 tiene un puerto 302 de entrada, un puerto 304 de salida y una cavidad interna que define una cámara 300 básica. El fluido fluye desde la placa 220 de flujo de fluido hasta el biorreactor 202 a través del puerto 302 de entrada y sale a través del puerto 304 de salida. La tapa 204 del biorreactor se une al biorreactor 202. Se puede usar una variedad de diferente hardware de montaje para mantener la tapa 204 del biorreactor y el biorreactor 202 juntos. La cámara 300 puede ser diseñada para acomodar uno o más sustratos o andamios 310. Además, el biorreactor 202 se puede subdividir en cámaras separadas que permiten las etapas de digestión de tejido, proliferación, diferenciación y formación de tejido. Cada cámara puede ser configurada con puertos de entrada y salida que se controlan independientemente a través de válvulas de control de flujo para un mayor control sobre la secuencia de ingeniería de tejidos. La circulación de fluido se efectúa mediante la activación de una o más válvulas 214 de control de flujo y la unidad 122 de bomba, en base a las señales de control de la CPU 128. Dependiendo de las válvulas específicas activadas, el funcionamiento de la unidad 122 de bomba mueve el fluido desde uno de los reservorios 208 de fluido hasta el biorreactor 202 o permite la recirculación del fluido dentro del biorreactor. Para procesos biológicos que requieren concentraciones estables de gases disueltos, la recirculación es ventajosa ya que permite que el fluido pase a través de una membrana que facilita el intercambio de gases. La naturaleza del intercambio se basa en las concentraciones disueltas en el biorreactor en comparación con las condiciones externas establecidas por la ECU 136. Se muestra que la tapa 204 del biorreactor tiene un puerto 332 de muestreo y sondas 216 sensoras que están conectadas operativamente a la cámara interior del biorreactor. Alternativamente, el puerto de muestreo se puede proporcionar en otro lugar en la carcasa del biorreactor. El puerto de muestreo permite la separación o adición de materiales dentro y fuera del biorreactor. El puerto de muestreo se puede reemplazar o aumentar con una membrana de intercambio de gases según se requiera.

La Figura 14 ilustra un biorreactor 202 multi-cámaras con la tapa 204 del biorreactor retirada para claridad. El puerto de entrada 302 está conectado a una cámara 322 de digestión de tejidos. La configuración de la cámara 322 de digestión de tejidos permite que sea cargada una biopsia del paciente en el biorreactor para su posterior digestión automatizada para producir células desasociadas. La ruta de circulación dentro de la cámara de digestión promueve la agitación suave de la biopsia para evitar áreas estancadas que podrían conducir potencialmente a una exposición excesiva del tejido de la biopsia a las enzimas de digestión circulantes. Además, la entrada y/o la salida de la cámara de digestión pueden alojar una membrana/malla 316 de filtro (no se muestra) de porosidad variable para proporcionar la clasificación celular y evitar la liberación de agregados de tejido parcialmente digeridos. El biorreactor contiene una segunda cámara 300 que aloja un sustrato o andamio 310 de proliferación para recibir células para la proliferación. El andamio de proliferación se puede formar en diversas geometrías que sostienen tanto la proliferación bidimensional como tridimensional, y puede comprender varios materiales biocompatibles que promueven la proliferación celular, tales como los biomateriales de fosfato de calcio (por ejemplo, Skelite™), biopolímeros o matrices naturales (por ejemplo, colágeno). Las células liberadas desde la cámara 322 de digestión de tejidos, o a través del puerto 334 de inoculación celular opcional, acaban dispersadas sobre o dentro del sustrato o andamio 310 de proliferación y proliferan, aumentando así la población celular para la posterior diferenciación celular y formación de tejido. Se debe tener en cuenta que el proceso se puede finalizar después de la proliferación si el objetivo es solamente aumentar la población celular sin diferenciación adicional. Un andamio 312 de diferenciación implantable está presente dentro de una cámara 306 de diferenciación/formación de tejido en la base del biorreactor 202. Al igual que con el andamio 310 de proliferación, el andamio 312 de diferenciación implantable se puede formar en diferentes geometrías y puede estar compuesto de una variedad de materiales biocompatibles que se seleccionan correctamente para cumplir los requisitos biológicos del sitio del implante (por ejemplo, Skelite™ es un implante ideal candidato para sitios esqueléticos).

En funcionamiento, las células se liberan desde el sustrato o andamio 310 de proliferación a través de una secuencia automatizada, tal como el suministro de enzimas (por ejemplo, tripsina) y la aplicación cronometrada de

impacto al biorreactor a través del impulsor 266 de impacto (no se muestra). La suspensión celular migra bajo las condiciones de flujo controlado presentes en el biorreactor hasta el andamio 312 implantable a través del embudo 314 celular, con lo cual las células se vuelven residentes e inician la secuencia de diferenciación y formación de tejido. Al concluir esta secuencia, el tejido así formado se puede retirar del biorreactor para su posterior implantación. Los expertos en la técnica deben entender que la realización particular del biorreactor de la Figura 14 es solo un ejemplo representativo de diseño. El biorreactor, en general, se puede configurar de varias maneras con respecto a la forma general, el tamaño y la configuración interna sin efectos adversos sobre la función. Por ejemplo, una membrana 336 de intercambio de gases presente en el biorreactor puede ser un componente separado y discreto que está conectado en línea con uno o más tubos 210 de suministro de fluido o la placa 220 de flujo del módulo 118 de ingeniería de tejidos. Además, las cámaras del biorreactor se pueden aislar una de otra a través de válvulas de control para evitar la necesidad de que todos los fluidos pasen por todas las cámaras. Cuando sea necesario, los pasadizos entre las cámaras se pueden abrir para efectuar la transferencia de fluidos y suspensiones celulares. Un ejemplo de una variación de este tipo que permite una mayor flexibilidad en las condiciones y secuencias de bioprocésamiento se ilustra en la Figura 17. Una configuración alternativa para permitir la exposición controlada del andamio 312 de diferenciación implantable a los contenidos del biorreactor es el uso de una lanzadera 318 que aísla el andamio implantable hasta que sea necesaria la siembra de células como parte de la etapa de diferenciación. Para hacer posible la siembra de células, la lanzadera 318 mueve el andamio implantable hasta el flujo de fluido desde una localización protegida dentro del biorreactor. Son posibles varias configuraciones de la lanzadera, incluyendo el movimiento basado en la rotación o el uso de una barrera desmontable que aísla el andamio implantable hasta que se requiera la siembra de células.

La Figura 15 ilustra un diseño de biorreactor rotativo que aprovecha la orientación del vector de gravedad para efectuar el transporte celular por sedimentación en diferentes fases del proceso de ingeniería de tejidos. Se debe tener en cuenta que aunque esta figura ilustra la rotación del biorreactor, el objetivo técnico se puede alcanzar igualmente mediante la rotación del módulo de ingeniería de tejidos o, de hecho, mediante la rotación de toda la carcasa 102. Como se muestra en la Figura 15, el biorreactor 202 está unido a un eje 350 de rotación que se fija a la columna 200 estructural del módulo 118 de ingeniería de tejidos. Esto proporciona un mecanismo para la rotación del biorreactor 202 con el fin de que se pueda producir la siembra de células mediante sedimentación sobre superficies de proliferación seleccionadas dentro de la cámara 300 de cultivo/proliferación. Las superficies de proliferación del biorreactor pueden estar recubiertas opcionalmente con biomateriales que mejoran la proliferación (por ejemplo, Skelite™), o puede ser insertado un sustrato o un andamio de proliferación dedicado en la cámara 300 para proporcionar este papel. Como una alternativa al uso de la cámara 322 de digestión, se proporciona un segundo puerto 352 de inoculación en el lado del biorreactor 202 para permitir la siembra directa de células. Las células se pueden sembrar inicialmente sobre una superficie 354 de proliferación que es relativamente pequeña (Figura 15a). Basándose en el tiempo de proliferación transcurrido o en la detección de la confluencia, las células pueden ser liberadas automáticamente y el biorreactor puede ser girado a través del eje 350 de rotación, de modo que las células liberadas desde la superficie 354 de proliferación se sedimentarán sobre el área superficial 356 aumentada (Figura 15b), permitiendo una mayor proliferación. Al finalizar la etapa de proliferación secundaria, las células expandidas se liberan y el biorreactor es girado de nuevo para permitir la siembra del andamio 312 implantable (Figura 15c). Por lo tanto, el eje 350 de rotación y los tubos 358 flexibles asociados permiten que el biorreactor 202 gire cuando sea necesario para maximizar el uso de la sedimentación por gravedad en etapas de proliferación secuencial. Se puede usar un eje de rotación para agitar o sacudir el biorreactor cuando tales condiciones sean deseables.

En referencia ahora a la Figura 16, el módulo 118 de ingeniería de tejidos se puede adaptar para incluir técnicas para el muestreo estéril de células suspendidas, fluidos de cultivo de tejidos y/o productos de desecho. En esta realización, un colector 400 de jeringa y puertos 402 de descarga estériles se integran en la columna 200 estructural del módulo 118 de ingeniería de tejidos. El tubo 406 microperforado conecta el colector de jeringa al biorreactor 202 a través del puerto 332 de muestreo. Las jeringas 404 están conectadas a los puertos 402 de descarga en el colector 400 para permitir la recogida y eliminación de muestras de fluidos o suspensiones de células para su posterior análisis sin comprometer la operación, integridad o esterilidad del proceso de ingeniería de tejidos. También se proporciona una técnica de muestreo alternativa mediante la cual una línea 408 de muestreo del biorreactor fusible se conecta a la tapa 204 del biorreactor. Como esta línea está físicamente unida al interior del biorreactor y está muy cerca de los sucesos biológicos en marcha, la línea contiene fluido sustancialmente de la misma composición que el presente dentro del biorreactor. En consecuencia, se puede obtener una muestra representativa del fluido del biorreactor fusionando los extremos de la línea de muestreo y retirando después la línea del módulo de ingeniería de tejidos para su posterior análisis. Será obvio para los expertos en la técnica que una línea fusible de este tipo se puede usar como base para una técnica de muestreo a través de la operación automática de sellar componentes dentro de la carcasa 102.

La Fig. 17 ilustra un esquema de flujo de fluidos más complejo para el módulo 118 de ingeniería de tejidos en el cual los diferentes requisitos para la digestión, proliferación y diferenciación se acomodan en cámaras separadas del biorreactor. Estas cámaras pueden estar presentes dentro de una serie de biorreactores discretos o combinadas dentro de un solo biorreactor que mantiene un control separado sobre las condiciones de cada cámara. Está presente una cámara 322 de digestión de tejidos que contiene una biopsia 320 de tejido. Está presente una cámara 300 de proliferación que está configurada para aceptar células de la cámara 322 de digestión y permite la siembra

de un sustrato o andamio 310 de proliferación. Una cámara 306 de diferenciación/formación de tejido también está presente y está configurada para aceptar la cantidad de células expandidas desde la cámara 300 de proliferación y permite la siembra de un andamio 312 implantable.

5 Los reactivos de ingeniería de tejidos (esto es, medios, soluciones enzimáticas, soluciones de lavado, etc.) se cargan en reservorios 208a-208e de fluido. Los productos de desecho en el reservorio 208f de fluidos, que pueden ser aspirados manualmente para fines de muestreo utilizando el puerto de acceso 212f. Los reservorios adicionales de fluidos pueden formar parte del sistema 206 de reservorios de fluidos y ser acomodados en el módulo de ingeniería de tejidos según se requiera para diferentes procesos de ingeniería de tejidos. El flujo de fluido a través del sistema está dirigido por el funcionamiento de las bombas 122a-122k de fluido, de las válvulas 214a-214c de control de flujo, y de las válvulas 410a-410c de flujo unidireccionales (esto es, válvulas de retención de flujo de fluido). Además, las bombas 212a-212k están configuradas para funcionar como bombas activas o válvulas pasivas (abiertas/cerradas), de acuerdo con las entradas de control de un microprocesador central. Los filtros 316a-316d se usan para controlar selectivamente el movimiento de las suspensiones celulares dentro del sistema y para limitar el paso de agregados celulares durante las fases de lavado y transición del proceso de ingeniería de tejidos. Los niveles de gases disueltos en los medios se mantienen mediante las membranas 282a y 282b de intercambio de gases en línea. Las jeringas 404a y 404b opcionales están presentes para permitir la recogida de células o el muestreo de medios a través de los puertos 402a y 402b de descarga estériles.

En funcionamiento, se inserta una biopsia 320 de tejido en la cámara 322 de digestión de tejido entre los filtros 316a y 316b. Un medio de digestión que contiene enzimas se bombea a la cámara 322 de digestión de tejidos desde el sistema 206 de reservorios de fluidos para iniciar el proceso de digestión. La digestión se puede mejorar agitando suavemente el medio de digestión dentro de la cámara de digestión a través de un diafragma de mezcla para maximizar la exposición del reactivo a la biopsia. El medio de digestión se puede recircular de forma continua o periódica a través de la bomba 122g. Durante la recirculación, el flujo de fluido se dirige hacia la parte inferior de la cámara de digestión, contra el vector de gravedad, para suspender y girar la biopsia de tejido, maximizando así la eficacia del proceso de digestión. El filtro 316a evita la migración de células y agregados celulares hacia la ruta del fluido. La trayectoria de recirculación incluye la membrana 282a de intercambio de gases en línea que proporciona niveles consistentes de gases disueltos en el medio de digestión. La introducción de una solución de lavado, contenida en el sistema 206 de reservorios de fluidos, en el fondo de la cámara 322 de digestión enjuaga la cámara de digestión y lava eficazmente el medio de digestión tanto de las células desasociadas como de cualquier agregado de células residuales. Después de un procedimiento de lavado único o múltiple, la aplicación de flujo inverso transfiere la suspensión celular a la cámara 300 de proliferación o a la jeringa 404a opcional para inspección o análisis externo. La transferencia de tejido parcialmente digerido fuera de la cámara de digestión se evita por el filtro 316b que está dimensionado para permitir el paso de células desasociadas y la retención de agregados celulares.

Las células generadas en el proceso de digestión de una biopsia o disponibles a través de la carga directa de una suspensión celular se siembran a través de flujo de fluido y/o sedimentación por gravedad en un sustrato o andamio 310 de proliferación presente dentro de la cámara 300 de proliferación. Después de un período de reposo para permitir la unión de las células al sustrato o andamio 310 de proliferación (para el ejemplo de unión de células dependientes), se introduce un medio de proliferación en la cámara 300 de proliferación desde el sistema 206 de reservorios de fluido. Este medio se reemplaza periódicamente con medio de proliferación fresco procedente del sistema 206 de reservorios a tiempos específicos durante la fase de proliferación. Entre las etapas de reemplazo del medio, el fluido dentro de la cámara de proliferación se recircula de forma continua o periódica bajo el control de las bombas 122g, 122h y 122i, más las válvulas 214a y 214b de control. Las rutas de suministro y recirculación de fluido incluyen la membrana 282a de intercambio de gases en línea que proporciona niveles consistentes de gases disueltos en el medio de proliferación. Durante una etapa de reemplazo del medio, el suministro de medio fresco desde el sistema 206 de reservorios de fluido se equilibra por la separación de fluido al reservorio 208f de residuos a través de la bomba 122f. Por lo tanto, a través de una combinación de etapas periódicas de reemplazo de medio y de recirculación controlada, el sistema de ingeniería de tejidos mantiene las condiciones óptimas dentro de la cámara de proliferación durante todo el proceso de proliferación.

Una vez que el cultivo celular se acerca a la confluencia, el medio dentro de la cámara 300 de proliferación es evacuado al reservorio 208f de residuos por la bomba 122f. En este proceso, la separación del fluido de la cámara de proliferación se equilibra mediante el aire estéril entrante suministrado a través de una porción de filtro estéril en la cámara de proliferación (no se muestra) o por la solución de PBS de lavado entrante desde el sistema 206 de reservorios de fluido. Las células se lavan extensamente mediante dos etapas de lavado consecutivas con la solución de lavado PBS para eliminar el medio de proliferación residual. Las células se liberan posteriormente desde el sustrato o andamio 310 de proliferación a través de una secuencia automatizada, tal como el suministro de enzimas (por ejemplo, tripsina) y la aplicación cronometrada de impacto al biorreactor a través de un impulso de impacto. Después de la liberación celular, el proceso enzimático se puede detener mediante la administración de medios que contengan suero que inhibe la actividad de la enzima. Con el fin de recoger las células para una siembra eventual sobre el andamio 312 implantable dentro de la cámara 306 de formación de tejido/diferenciación, la suspensión celular es transferida desde la cámara 300 de proliferación al filtro 316c. El filtro 316c evita el paso de células, pero permite que el medio continúe a través de la válvula 214b hasta el reservorio 208f de residuos bajo el control de la bomba 122f. Las células recogidas se liberan entonces del filtro 316c mediante la aplicación de flujo

inverso y se envían o bien a la cámara 306 de diferenciación/formación de tejido o bien a la jeringa 404b opcional para inspección o análisis externo.

La siembra de células sobre el andamio 312 de diferenciación implantable se logra transfiriendo las células desde el filtro 316c hasta la superficie superior del andamio a través de la bomba 122j. La pérdida de células fuera del andamio se minimiza mediante el uso opcional de una membrana o malla 326 de andamio. Después de la siembra de células, se pueden introducir nuevos medios de diferenciación en la cámara 306 de diferenciación/formación de tejido a través de una entrada secundaria mediante el funcionamiento de la bomba 122k. Esta entrada secundaria se ubica lejos de la región del andamio implantable que se siembra con células para minimizar el potencial de las tensiones dañinas de cizallamiento que podrían comprometer la formación de agregados celulares. El medio de diferenciación se reemplaza periódicamente con medio de diferenciación nuevo procedente del sistema 206 de reservorios en momentos específicos durante la fase de diferenciación. Entre las etapas de reemplazo del medio, el fluido dentro de la cámara de diferenciación/formación de tejido se recircula de forma continua o periódica bajo el control de las bombas 122j o 122k, más la válvula de control 214b. La ruta para el suministro tanto de medio de diferenciación fresco como de medio recirculado incluye la membrana 282b de intercambio de gases en línea que proporciona niveles consistentes de gases disueltos en el medio de diferenciación. Durante una etapa de reemplazo del medio, el suministro de medio fresco desde el sistema 206 de reservorios de fluido se equilibra mediante la separación del fluido al reservorio 208f de residuos a través de la bomba 122f. Las condiciones ambientales dentro de la cámara de diferenciación/formación de tejido se monitorizan y controlan durante el período de tiempo necesario para la formación satisfactoria del constructo de tejido, en cuyo momento se abre la cámara de diferenciación/formación de tejido del biorreactor y se recupera el constructo para su posterior uso clínico o de investigación.

La Figura 18 ilustra una variación del esquema de flujo de fluido de la Figura 17, donde el andamio o el sustrato 310 de proliferación dentro de la cámara 300 de proliferación se reemplaza con un sustrato de proliferación plano de un área superficial relativamente grande. La orientación del sustrato es tal que la sedimentación celular bajo gravedad distribuye uniformemente las células sobre la superficie de proliferación. Siempre que se mantenga la orientación correcta de la cámara de proliferación, el sustrato de proliferación puede estar en forma de una placa de cultivo de polímero rígido o un recipiente de pared flexible.

La Figura 19 muestra un biorreactor 500 de digestión de tejidos que contiene una cámara 322 de digestión de tejidos de un tamaño apropiado para acomodar una o más muestras de tejido, tales como una biopsia 320 de tejido. El biorreactor 500 consiste en cuatro componentes principales: una base 502 de biorreactor que forma sustancialmente la cámara 322 de digestión de tejidos, una tapa 504 de biorreactor extraíble, filtro 316b de puerto y filtro 316a de puerto opcional (no se muestra).

La tapa 504 del biorreactor proporciona un puerto 506 de medios con un filtro 316a de puerto opcional (no se muestra) y un puerto 508 de salida de aire. La base 500 del biorreactor aloja el filtro 316b que permite el paso de las células desasociadas fuera de la cámara 322 de digestión de tejidos, a través del puerto 510 de medios, y la retención de agregados de tejidos y restos de biopsias.

Después de la inserción de la biopsia 320 de tejido, el biorreactor se llena bajo control automático con una solución de enzima a través del puerto 506 o del puerto 510. La adición de solución de enzima a la cámara 322 de digestión de tejidos se equilibra mediante el escape de aire a través del puerto 508. La digestión de la biopsia tiene lugar bajo una recirculación continua o intermitente de la solución de enzima, manteniendo de este modo las células liberadas en suspensión y maximizando la exposición de la biopsia a los reactivos enzimáticos. Durante la recirculación, la solución de enzima entra en el biorreactor a través del puerto 510 y sale a través del puerto 506. Esto crea una trayectoria de flujo de fluido en una dirección opuesta al vector de gravedad, de tal modo que la biopsia se suspende y se voltea para maximizar la efectividad de los reactivos enzimáticos. La digestión se puede mejorar agitando suavemente el medio de digestión dentro de la cámara de digestión a través de un diafragma de mezcla (no se muestra). El puerto 508 se puede cerrar durante cualquier etapa de recirculación, ya que las burbujas de aire presentes en el sistema de flujo de fluido quedan atrapadas en la mitad superior del biorreactor por encima de la entrada 512 del puerto 506. Una vez completada la secuencia de digestión, la aplicación de flujo inverso de aire o de medio a través del puerto 506 transfiere las células desasociadas a través del puerto 510 o bien a una cámara de proliferación o bien a un recipiente de recogida de células.

La Figura 20 muestra un biorreactor 520 de proliferación que proporciona una cámara 300 de proliferación. El fondo de la cámara de proliferación consiste en un sustrato 310 de proliferación adecuado para la unión y el crecimiento de las células. Para ajustar o mantener los niveles de gases disueltos en el medio, se puede incorporar una membrana permeable a los gases (no se muestra) a la superficie superior de la cámara de proliferación que permite el transporte de gases tales como el oxígeno y el CO<sub>2</sub>. Las paredes 522 de separación dividen el espacio interno de la cámara de proliferación en un sistema de canales que obliga al medio a seguir una ruta predefinida desde el puerto 524 de entrada hasta el puerto 526 de salida.

El diseño del biorreactor de proliferación tiene varias características operativas importantes. Se puede obtener una siembra de células relativamente uniforme mediante la perfusión de una suspensión de células a través del sistema de canales. Además, la configuración del canal asegura que el flujo de medios está bien distribuido sobre toda la

superficie de proliferación, lo que reduce las posibles regiones de flujo bajo que pueden comprometer la vitalidad de las células locales debido a un suministro nutricional reducido o la eliminación del producto de desecho. Al final de la secuencia de proliferación, la recirculación continua o intermitente de una solución enzimática apropiada a través del sistema de canales induce un desprendimiento uniforme de células debido al efecto de la reacción enzimática y los bajos niveles de estrés de cizallamiento generado por el flujo de fluido. En consecuencia, la recogida de células se logra sin necesidad de agitación o rotación mecánica de la cámara de proliferación.

La Figura 21 muestra un biorreactor 530 de diferenciación diseñado para promover la diferenciación celular y la subsiguiente formación de constructos de tejido. El biorreactor consiste en cuatro componentes principales: una base 532 de biorreactor que forma sustancialmente una cámara 306 de diferenciación/formación de tejido, una tapa 534 de biorreactor desmontable, un tubo 326 de membrana permeable y un andamio 312 de diferenciación. El tubo 326 de membrana permeable rodea fuertemente el retículo del andamio para formar un compartimiento 536 de crecimiento de tejido por encima del andamio. El compartimiento de crecimiento de tejido se puede extender dentro del andamio según el tamaño de poro del andamio y la colocación del andamio dentro del tubo de membrana. El tubo de membrana también se fija a la entrada 540 del puerto 542, de manera que la membrana está físicamente localizada centralmente dentro de la cámara 306 de diferenciación/formación de tejido. Esto divide al biorreactor en dos compartimientos independientes, un compartimiento 536 de crecimiento de células y tejido y un compartimiento 538 de medio externo exento de células, todo dentro de la cámara 306 global de diferenciación/formación de tejido. El tamaño de poro del tubo de la membrana se selecciona sobre la base de ser impermeable para las células pero permeable para los nutrientes, productos de desecho, factores de crecimiento, etc., dentro del medio de cultivo. Si se desea, el tamaño del poro de la membrana se puede elegir de manera que se excluya que las moléculas de un cierto peso molecular pasen a través de la membrana.

La tapa 534 del biorreactor tiene dos puertos 542 y 544 de salida de aire, y un puerto 546 de entrada de medios. La base 532 del biorreactor aloja dos puertos 548 y 550 adicionales. El puerto 546 de entrada es necesario para cargar una suspensión celular en el compartimiento 536 de crecimiento de tejido y para la perfusión del constructo de tejido emergente con medio de cultivo. Durante el suministro de la suspensión celular al compartimiento vacío de crecimiento de tejido, se permite que el aire atrapado salga por el puerto 542. De manera similar, el compartimiento 538 exterior libre de células se carga con el medio a través del puerto 548 o el puerto 550 y el aire atrapado puede escapar a través del puerto 544.

El diseño del biorreactor de diferenciación permite la perfusión directa del constructo de tejido a través del suministro de medios al puerto 546 o el suministro indirecto de medios al compartimiento 538 circundante libre de células a través del puerto 548. Típicamente, los puertos 542 y 544 se cierran durante la perfusión y el puerto 550 sirve como salida del medio; sin embargo, son posibles varios escenarios alternativos de suministro de medios basados en requisitos específicos de ingeniería de tejidos. Un aspecto importante de la estrategia de perfusión de medios es que la membrana 326 permeable, que forma parte del compartimiento de crecimiento de tejido, permite que el medio de cultivo fresco permee al compartimiento de crecimiento de tejido sin ninguna pérdida de células fuera del andamio. Además, se proporciona nutrición a las células desde prácticamente todas las direcciones sin restricciones desde cualquier pared impermeable del biorreactor.

La Figura 22 ilustra una realización adicional del esquema de flujo de fluido en el que se pueden emplear los biorreactores de las figuras 19-21. Se encuentra una cámara 322 de digestión de tejidos que aloja una biopsia de tejido. Está presente una cámara 300 de proliferación que está configurada para aceptar células procedentes de la cámara 322 de digestión y permite la siembra de un sustrato de proliferación. Una trampa 560 de burbujas elimina las burbujas de aire de la línea de entrada a la cámara de proliferación y, por lo tanto, evita que estas burbujas entren en la cámara 300 de proliferación y comprometan potencialmente las poblaciones de células localizadas. Un reservorio 562 está presente para aceptar la cantidad creciente de células a partir de la cámara 300 de proliferación y para servir como un recipiente de retención temporal durante un procedimiento de lavado de células y de concentración de células realizado con la ayuda de un módulo 564 de filtración de flujo cruzado. También está presente una cámara 306 de diferenciación/formación de tejido que está configurada para aceptar las células del reservorio 562 después de la etapa de lavado y concentración y permite la siembra de un andamio 312 implantable.

Los reactivos de ingeniería de tejidos (esto es, medios, soluciones enzimáticas, soluciones de lavado, etc.) se almacenan en los reservorios 208a-208e de fluido. Los productos de desecho se recogen en el reservorio 208f de fluido. El flujo de fluido a través del sistema está dirigido por el funcionamiento de las bombas 122a y 122b de fluido, de las válvulas 214a-214v de control de flujo de acuerdo con las entradas para control de un microprocesador central. Los filtros 566a-566c de aire permiten la transferencia de aire dentro o fuera del sistema según se requiera durante la operación sin comprometer la esterilidad del sistema. Además, las membranas de intercambio de gases en línea (no se muestran) se pueden desplegar en varias localizaciones dentro de las rutas de flujo del fluido para facilitar el control de los gases disueltos en el medio de cultivo.

En funcionamiento, se inserta una biopsia 320 de tejido en la cámara 322 de digestión de tejido. Se bombea un medio de digestión que contiene enzimas a la cámara 322 de digestión de tejido desde un reservorio 208 de fluido para iniciar el proceso de digestión. El medio de digestión puede ser recirculado de manera continua o periódica a través de la bomba 122a, manteniendo así en suspensión las células liberadas y maximizando la exposición del reactivo a la biopsia. La introducción de un medio de cultivo de proliferación desde uno de los reservorios 208 de

fluido en la parte superior de la cámara 322 de digestión transfiere la suspensión celular a la cámara 300 de proliferación y simultáneamente diluye la solución de enzima hasta una concentración que sea tolerable para la proliferación celular en la cámara 300 de proliferación. La transferencia de tejido parcialmente digerido fuera de la cámara de digestión se evita por el filtro 316b del puerto que está dimensionado para permitir el paso de células desasociadas y la retención de agregados celulares. Las células generadas a partir del proceso de digestión de la biopsia se distribuyen homogéneamente en toda la cámara 300 de proliferación o bien por la recirculación de la suspensión celular mediante la activación de las válvulas 214h, 214j, 214l y la bomba 122a, o bien por la aplicación automática de agitación suave del biorreactor de proliferación.

Después de un período de reposo para permitir la unión de las células al sustrato de proliferación, el medio de proliferación se reemplaza periódica o continuamente con medio de proliferación fresco procedente de uno de los reservorios 208 de fluido. Durante una etapa de reemplazo del medio, el suministro de medio fresco desde el sistema 208 de reservorios de fluido se equilibra por la separación del fluido al reservorio 208f de residuos a través de la válvula 214i.

Una vez que el cultivo celular se aproxima a la confluencia, el medio dentro de la cámara 300 de proliferación es evacuado al reservorio 208f de residuos. En este proceso, la separación del fluido desde la cámara de proliferación se equilibra por el aire estéril entrante suministrado a través de un filtro estéril 566a o por la solución de lavado de PBS entrante desde uno de los reservorios 208 de fluido.

Las células se liberan posteriormente desde el sustrato de proliferación a través de una secuencia automatizada, tal como el suministro de enzimas (por ejemplo, tripsina) y la recirculación cronometrada de la suspensión celular o la aplicación cronometrada de impacto o agitación al biorreactor a través de un impulso de impacto. Para eliminar las enzimas y recoger las células en un volumen relativamente pequeño de medio para su posterior transferencia a la cámara 306 de diferenciación celular, la suspensión celular se transfiere desde la cámara 300 de proliferación al reservorio 562. La suspensión celular se recircula entonces continuamente mediante las válvulas 214m, 214j, 214q y la bomba 122a a través del módulo 564 de filtración de flujo cruzado. La membrana en el módulo 564 de filtración de flujo cruzado evita la pérdida de células, pero permite que un cierto porcentaje de medio (permeato) sea separado a través de la válvula 214o al reservorio 208f de residuos. La consecuencia es una reducción del volumen de la suspensión y/o la dilución de cualquier enzima presente, siempre que la separación del permeato se compense con el suministro de medio fresco desde uno de los reservorios 208 de fluido. El flujo continuo reduce el potencial de que las células queden atrapadas dentro de la membrana del módulo 564 de flujo cruzado.

La siembra de células sobre el andamio 312 de diferenciación implantable se logra transfiriendo las células lavadas desde el reservorio 562 a la superficie superior del andamio mediante las válvulas 214m, 214j, 214p, y la bomba 122a. La pérdida de células fuera del andamio se minimiza mediante el uso opcional de una membrana o malla 326 de andamio. Después de la siembra de células, se puede introducir nuevo medio de diferenciación en la cámara 306 de diferenciación/formación de tejido a través del funcionamiento de la bomba 122b. El medio de diferenciación se reemplaza periódica o continuamente con medio de diferenciación fresco desde el sistema de reservorios. Durante una etapa de reemplazo de medio, el suministro de medio fresco desde uno de los reservorios 208 de fluido se equilibra por la separación del fluido al reservorio 208f de residuos mediante la válvula 214u. Entre las etapas de reemplazo del medio, el fluido dentro de la cámara de diferenciación/formación de tejido se recircula de forma continua o periódica bajo el control de la bomba 122b, la válvula 214t, y la válvula 214r para perfusión a través del constructo de tejido o la válvula 214s para el suministro fuera de la membrana 326 del andamio. Esta ruta secundaria de suministro de fluido fuera de la membrana del andamio se localiza lejos de la región del andamio implantable que se siembra con células para minimizar el potencial de daños por esfuerzos de cizallamiento que podrían comprometer la formación de agregados celulares. Al igual que con las realizaciones anteriores del esquema de flujo de fluido, las condiciones ambientales dentro de la cámara de diferenciación/formación de tejido se monitorizan y controlan durante el período de tiempo necesario para la formación satisfactoria del constructo de tejido, en cuyo momento se abre la cámara de diferenciación/formación de tejido del biorreactor y se recupera el constructo para su posterior uso clínico o de investigación.

La Figura 23 ilustra una realización de un módulo de ingeniería de tejidos descrito en la presente memoria que comprende tres biorreactores. La Figura 23 ilustra el uso combinado del biorreactor de digestión de tejidos de la Figura 19 que tiene una cámara 322 interna de digestión de tejido, con el biorreactor de proliferación de la Figura 20 que tiene una cámara 300 de proliferación, y el biorreactor de diferenciación de la Figura 21 que tiene una cámara 306 de diferenciación. Estos biorreactores están conectados de manera operativa a un módulo de ingeniería de tejidos para proporcionar las etapas automatizadas implicadas en la secuencia de digestión de tejidos, proliferación celular, diferenciación celular y formación de tejido.

Los expertos en la técnica entenderán que el sistema automatizado de ingeniería de tejidos puede comprender uno o más biorreactores sostenidos en una carcasa por un soporte estructural o por medios equivalentes. Cuando comprende dos o más biorreactores, los biorreactores pueden estar conectados operativamente o alternativamente, ser independientemente operables y/o cooperativamente operables. Además, cada biorreactor puede comprender diferentes cámaras internas o el mismo tipo de cámaras. En una realización adicional, las cámaras y/o los biorreactores están conectados operativamente para proporcionar el intercambio de fluidos, células y/o tejidos entre las cámaras y/o los biorreactores.

5 El sistema automatizado de ingeniería de tejidos de la invención es fácil de preparar para su uso. La siguiente secuencia es un ejemplo representativo para la preparación de un implante de cartílago basado en el uso del sistema de ingeniería de tejidos de la presente invención para la reparación de defectos focales en el cartílago articular. Para esta aplicación, se requieren las fases de digestión del tejido, la proliferación celular y la diferenciación celular/formación de tejido. Las tres fases del proceso de ingeniería de tejidos se pueden realizar por medio de un único biorreactor con múltiples cámaras o tres biorreactores separados y discretos, como se muestra en las figuras 17, 18 y 22.

10 Antes de iniciar la secuencia de ingeniería de tejidos, se cargan las siguientes composiciones de reactivos en los reservorios 208a a 208e en el módulo de ingeniería de tejidos a través de los puertos 212 de inyección de reservorio. El reactivo A se utiliza para la digestión de condrocitos derivados de pequeñas biopsias de cartílago articular humano. Los reactivos B, D y E se utilizan para la proliferación celular. El reactivo C se utiliza para la diferenciación y la formación de constructos de tejido.

15 • Reactivo A: Medio de digestión: DMEM/F-12, FCS al 5% o suero autólogo, 1 µg/ml de insulina, 50 µg/ml de ácido ascórbico, 100 UI/100 µg/ml de penicilina/estreptomicina, Tampón Hepes al 2,5%, pronasa al 0,1% (1 mg/ml) y colagenasa al 0,025% (0,25 mg/ml), pH 7,4

• Reactivo B: Medio de proliferación: DMEM/F-12, FCS al 10% o suero autólogo, 10 µg/ml de ácido ascórbico, 100 UI/100 µg/ml de penicilina/estreptomicina, Tampón Hepes al 2,5%, pH 7,4

• Reactivo C: Medio de diferenciación: DMEM/F-12, FCS al 10% o suero autólogo, 1 µg/ml de insulina, 50 µg/ml de ácido ascórbico, 100 UI/100 µg/ml de penicilina/estreptomicina, Tampón Hepes al 2,5%, pH 7,4

20 • Reactivo D: Solución de lavado PBS: NaCl 137 mM, KCl 3,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O 8 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM, en H<sub>2</sub>O, pH 7,4

• Reactivo E: Solución de liberación de células: solución de tripsina 1x

25 Los reactivos anteriores son nominalmente estables durante períodos de hasta varias semanas cuando se almacenan a 4°C sobre el módulo de ingeniería de tejidos dentro del envoltorio del sistema. Las enzimas se pueden conservar liofilizadas dentro del módulo de ingeniería de tejidos y se pueden hidratar en el momento de su uso. Esto permite una adaptación personalizada de las enzimas para la aplicación específica de la ingeniería de tejidos.

30 Se obtiene una biopsia de cartílago humano (100-500 mg) por medio de una cirugía artroscópica de un área que no lleva carga sobre el cóndilo femoral medial superior. Antes de cargar la biopsia en la cámara de digestión, se pesa la biopsia y se registra la masa para la entrada posterior de datos en la secuencia de programación para la unidad base. Después de la determinación de la masa, se coloca la biopsia dentro de la cámara de digestión y se cierra el biorreactor listo para que el módulo de ingeniería de tejidos sea insertado en la unidad base del sistema de ingeniería de tejidos. Una vez que se ha instalado el módulo de ingeniería de tejidos, se programa entonces la CPU de la unidad base a través de la interfaz de usuario de acuerdo con el tamaño de la biopsia y la secuencia de ingeniería de tejidos deseada.

35 Al inicio de la secuencia automatizada programada, se empieza la digestión de la biopsia con pronasa/colagenasa por una infusión de Reactivo A en la cámara de digestión del biorreactor a través de la activación de las válvulas de flujo necesarias y el funcionamiento de la bomba de suministro de fluido. La digestión se realiza a 37°C durante un período de 16 horas bajo recirculación continua o intermitente del Reactivo A para mantener las células en suspensión y para maximizar la exposición del reactivo a la biopsia. Esto puede ir seguido por dos etapas consecutivas de lavado con Reactivo D. Al final de esta secuencia de digestión, se obtienen aproximadamente 200.000 a 500.000 células por 100 mg de tejido de biopsia.

En este punto, se puede recuperar una muestra de las células digeridas a través del puerto de muestreo para evaluar el número y la vitalidad de las células. Esta evaluación biológica generalmente se evalúa fuera del sistema por medio de un hemocitómetro después de teñir con azul de tripano.

45 Bajo el control automatizado de la unidad base, las células desasociadas se suministran al sustrato o andamio de proliferación presente en la cámara de proliferación del biorreactor para establecer una densidad de siembra de células entre 2000 células/cm<sup>2</sup> y 15000 células/cm<sup>2</sup>. Para efectuar la proliferación continua hacia la confluencia, se suministra el Reactivo B desde un reservorio sobre el módulo de ingeniería de tejidos de acuerdo con un perfil de flujo preprogramado. La temperatura y el pH del medio se monitorizan para detectar desviaciones de 37°C y pH 7,4, respectivamente. Además, se evalúa el estado de la proliferación celular indirectamente mediante la detección del recambio metabólico en función del tiempo (p. ej., pH, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, ácido láctico y consumo de glucosa). El nivel de confluencia también es sostenido por monitorización óptica a través de una cámara CCD conectada a la sonda de proliferación incorporada dentro de la cámara de proliferación. Una vez que se determina la confluencia inminente ya sea empíricamente o por medio de una monitorización basada en sensores, las células se lavan extensamente mediante dos etapas de lavado consecutivas con Reactivo D para eliminar todo medio de cultivo.

La separación de las células propagadas del sustrato o andamio de proliferación se inicia por la transferencia de Reactivo E desde un reservorio dentro del módulo de ingeniería de tejidos a la cámara de proliferación. Esta solución de tripsina está presente durante 5 minutos dentro del biorreactor, tras lo cual la reacción se detiene mediante la adición automática de Reactivo B que contiene FCS o suero autólogo que inhibe la actividad de la enzima. La liberación celular desde el sustrato o andamio de proliferación se mejora aún más por la aplicación de un impacto de baja frecuencia al biorreactor a través del impulso de impacto o la recirculación de la solución de tripsina. Una vez liberadas, se realiza una etapa de lavado y filtrado de las células para eliminar la tripsina y para concentrar la suspensión celular para su posterior transferencia al andamio presente en el biorreactor de diferenciación/formación de tejido.

Para esta solicitud, una configuración bipolar es ideal ya que proporciona una capa de cartílago en la superficie articular que está conectada a una capa de andamio porosa, formada por un biomaterial óseo tal como Skelite™, para la integración con el hueso subcondral. La preparación del constructo bipolar se puede lograr a través de uno de varios procedimientos alternativos. El andamio de diferenciación se puede formar con un gradiente de densidad de poros que atrapa preferiblemente las células en un extremo, creando una región de alta concentración celular que promueve la formación de la capa de cartílago. Alternativamente, el andamio se puede recubrir previamente en un extremo con gel de fibrina para evitar la unión celular y la formación de matriz de cartílago en esta región. Con cualquiera de estas estrategias, la pérdida de células fuera del andamio se minimiza mediante el uso opcional de una membrana o malla circundante. La velocidad de flujo para el suministro de células es baja para asegurar que el cizallamiento del fluido no dañe la población de células proliferadas. Después de la finalización de la etapa de siembra de las células, el flujo de fluido a través de la cámara de diferenciación/formación de tejido se detiene para permitir la formación de agregados celulares, ya que como es sabido esto es crucial en términos de diferenciación satisfactoria. Después de esta etapa importante, la perfusión de Reactivo C se realiza durante el período de tiempo necesario para la formación y maduración del tejido con el fin de suministrar nutrientes a las células de manera óptima y eliminar los productos de desecho. Después de este período de cultivo, las células habrán producido una matriz extracelular que es sustancialmente idéntica a la del cartílago articular humano nativo. Las propiedades del tejido formado se pueden confirmar mediante métodos bioquímicos externos independientes, tales como la tipificación del colágeno mediante SDS-PAGE y expresión génica. Como etapa final del procedimiento, el sistema de ingeniería de tejidos proporciona una notificación a través de la interfaz del usuario de que la secuencia está completa y que el módulo de ingeniería de tejidos se puede retirar para recoger el implante. El módulo de ingeniería de tejidos o una forma desmontable del biorreactor se puede transportar al quirófano, tras lo cual se retira la tapa del biorreactor en un campo estéril y se extrae el implante para uso quirúrgico.

Cabe señalar que el sistema de la invención está limitado al uso con un tipo particular de célula o tejido autólogo, alogénico o xenogénico. Por ejemplo, se puede preparar un implante esquelético para uso en la reconstrucción de defectos óseos. En esta solicitud, se podría utilizar la médula ósea como la fuente de las células primarias y/o precursoras requeridas para el procedimiento de ingeniería de tejidos. En consecuencia, no hay ningún requisito para realizar la digestión de tejidos; por lo tanto, el biorreactor puede ser del tipo que solo sostiene la proliferación y la diferenciación. Dependiendo de la población de células disponible y del tamaño requerido del implante, puede que no se requiera una proliferación uniforme. En este caso, la configuración del biorreactor se puede dirigir a la fase única de la diferenciación celular y la formación de tejido en curso. El constructo de tejido final estaría compuesto por un andamio implantable, que puede estar compuesto de un biomaterial óseo tal como Skelite™, con células óseas activas que recubren los poros abiertos del andamio y que dejan activamente una nueva matriz mineralizada (osteoide). Dicho implante se integraría rápidamente en el sitio del implante, acelerando así el proceso de recuperación.

Como un ejemplo adicional de la flexibilidad del sistema, se pueden preparar vasos sanguíneos por ingeniería de tejidos utilizando células endoteliales expandidas de cultivo sembradas sobre andamios flexibles de una geometría tubular en la fase final de diferenciación.

El sistema integrado de ingeniería de tejidos de la presente invención tiene varias ventajas en comparación con los métodos y sistemas de la técnica anterior. En particular, la operación llave en mano del dispositivo permite realizar procedimientos complejos de ingeniería de tejidos bajo control automatizado en la clínica, lo que evita la necesidad de transportar células a instalaciones centralizadas para el procesamiento biológico. El sistema es fácil de usar y evita los procedimientos existentes de cultivo de tejidos humanos que necesitan mucho tiempo y son costosos y que a menudo llevan a la contaminación y fallo de los implantes. Los módulos de ingeniería de tejidos y los conjuntos de subsistemas asociados se pueden personalizar para el tipo de célula o tejido que se va a cultivar y se pueden fabricar a partir de cualquier material adecuado biocompatible y tolerante a la esterilización. El módulo entero de ingeniería de tejidos o sus componentes específicos son reemplazables y se pueden considerar desechables. El módulo de ingeniería de tejidos se puede proporcionar en un paquete estéril de un solo uso que simplifica la configuración y el funcionamiento del sistema en ámbitos clínicos.

Los expertos en la técnica entenderán que el módulo y el dispositivo de ingeniería de tejidos de la presente invención se pueden fabricar en diferentes tamaños, formas y orientación. El dispositivo se puede fabricar para incorporar un solo módulo de ingeniería de tejidos o múltiples módulos en formatos verticales u horizontales. Por consiguiente, se pueden hacer subconjuntos que correspondan al formato espacial seleccionado para el dispositivo de ingeniería de tejidos. Por lo tanto, diferentes tipos de ingeniería de tejidos se pueden llevar a cabo

simultáneamente en un solo dispositivo siendo cada secuencia de ingeniería de tejidos monitorizada y controlada automáticamente de forma individual. También está dentro del alcance de la invención tener una pluralidad de sistemas automatizados de ingeniería de tejidos que operan y están conectados en red bajo el control de un ordenador remoto.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para (a) la proliferación automatizada de células autólogas, alogénicas o xenogénicas para uso en procedimientos de ingeniería de tejidos, comprendiendo dicho método:
  - 5 - sembrar las células sobre o dentro de un sustrato o andamio de proliferación sostenido dentro de un biorreactor (202) conectado con un sistema (206) de reservorio y flujo de medios, teniendo dicho biorreactor (202) sensores (132, 134) para detectar los cambios en las condiciones ambientales que comprenden pH y temperatura y gases disueltos dentro de dicho biorreactor (202), cuyos sensores (132, 134) generan señales que son monitorizadas por un microprocesador (128), y cuyo microprocesador (128) controla y personaliza el ambiente interno del biorreactor (202) para cumplir así los requisitos de proliferación celular dentro del biorreactor (202);
  - 10 - monitorizar y mantener condiciones adecuadas de cultivo dentro de dicho biorreactor (202) durante un periodo de tiempo suficiente para un nivel deseado de proliferación celular, en donde el estado de proliferación celular es evaluado indirectamente por la detección del recambio metabólico en función del tiempo y la evaluación del estado de proliferación celular comprende determinar el nivel de confluencia mediante monitorización a base de sensores.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende además (b) la diferenciación automatizada de células, comprendiendo dicho método:
  - 15 - sembrar las células sobre o dentro de un sustrato o andamio de diferenciación sostenido dentro del biorreactor (202) conectado con un sistema (206) de reservorio y flujo de medios, teniendo dicho biorreactor (202) sensores (132, 134) para detectar los cambios en las condiciones ambientales que comprenden pH y temperatura y gases disueltos dentro de dicho biorreactor (202), cuyos sensores (132, 134) generan señales que son monitorizadas por el microprocesador (128), y cuyo microprocesador (128) monitoriza el progreso de la diferenciación celular y ajusta las condiciones ambientales del biorreactor (202) para cumplir así los requisitos de diferenciación celular dentro del biorreactor (202);
  - 20 - monitorizar el progreso de la diferenciación celular dentro del biorreactor (202) para mantener así condiciones adecuadas de cultivo dentro de dicho biorreactor (202) durante un periodo de tiempo suficiente para un nivel deseado de diferenciación celular.
3. El método de las reivindicaciones 1 o 2, que comprende además (c) la producción de un constructo de tejido, comprendiendo dicho método:
  - 25 - sembrar las células sobre o dentro de un andamio, estando sostenido el andamio dentro de un biorreactor (202) conectado con un sistema (206) de reservorio y flujo de medios, teniendo dicho biorreactor (202) sensores (132, 134) para detectar los cambios en las condiciones ambientales que comprenden pH y temperatura y gases disueltos dentro de dicho biorreactor (202), cuyos sensores (132, 134) generan señales que son monitorizadas por un microprocesador (128), y cuyo microprocesador (128) monitoriza el progreso de desarrollo de tejido y ajusta las condiciones ambientales del biorreactor (202) para cumplir así los requisitos para la formación de tejido dentro del biorreactor (202);
  - 30 - monitorizar el progreso de desarrollo de tejido para mantener así las condiciones adecuadas de cultivo dentro de dicho biorreactor (202) durante un periodo de tiempo suficiente para que dichas células expresen una matriz extracelular que proporciona el soporte estructural para el constructo de tejido.
4. El método de las reivindicaciones 1, 2 o 3, en donde las medidas de pH, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y consumo de glucosa se utilizan para detectar el recambio metabólico.
- 40 5. El método de la reivindicación 1, en donde la monitorización basada en sensores comprende la monitorización óptica mediante una cámara CCD.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en donde el constructo de tejido formado es un implante de cartilago, implante esquelético o un núcleo interno de un disco espinal.
7. Un sistema automatizado de cultivo celular y/o de ingeniería de tejidos que comprende:
  - 45 - uno o más biorreactores (202) comprendiendo cada uno de dichos biorreactores (202) una o más cámaras adecuadas para facilitar las funciones fisiológicas celulares y/o la generación de una o más poblaciones de células y/o constructos de tejido en un modo de proceso secuencial y/o concurrente dentro de y/o entre las cámaras y/o biorreactores (202) deseados, durante el uso; en donde dichos uno o más biorreactores (202) están conectados operativamente con el sistema (206) de reservorio y flujo de medios,
  - 50 - sensores (132, 134) asociados con dichos uno o más biorreactores (202) para detectar cambios en las condiciones ambientales que comprenden el pH y la temperatura y los gases disueltos dentro de dicho biorreactor (202), y cuyos sensores (132, 134) generan señales que son monitorizadas por un microprocesador (128);
  - medios de detección del recambio metabólico en función del tiempo para evaluar el estado de proliferación celular;

- medios de monitorización a base de sensores para determinar el nivel de confluencia;
  - un microprocesador (128) para efectuar dicho procesamiento biológico de modo secuencial y/o concurrente durante el uso, y que durante el uso controla y personaliza el ambiente interno del biorreactor (202) para cumplir así los requisitos de las diferentes fases de cultivo celular y/o desarrollo de tejido dentro del biorreactor (202), en respuesta a la monitorización de las señales generadas por los sensores (132, 134);
- 5
- en donde, en uso, el microprocesador (128) monitoriza el progreso de la proliferación de células autólogas, alogénicas o xenogénicas, y opcionalmente, la diferenciación celular y/o el desarrollo de tejido, y mantiene condiciones de cultivo adecuadas dentro de dicho biorreactor (202) durante un periodo de tiempo suficiente para un nivel deseado de proliferación celular y opcionalmente, durante un periodo de tiempo suficiente para un nivel deseado de diferenciación celular y/o durante un periodo de tiempo suficiente para que dichas células expresen una matriz extracelular que proporciona el soporte estructural para el constructo de tejido.
- 10
8. El sistema de la reivindicación 7, en donde la detección del recambio metabólico en función del tiempo comprende medir el pH, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y el consumo de glucosa.
9. El sistema de la reivindicación 7, en donde la monitorización basada en sensores comprende la monitorización óptica, en donde los medios de monitorización óptica comprenden una cámara CCD.
- 15
10. El sistema de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde dichas una o más cámaras se seleccionan del grupo que consiste en una cámara de digestión de tejidos, cámara de cultivo/proliferación, cámara de diferenciación/formación de tejido y combinaciones de las mismas.
11. El sistema de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en donde dichas cámaras y/o biorreactores (202) se proporcionan conectados operativamente.
- 20
12. El sistema de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en donde al menos uno de dichas cámaras y/o biorreactores (202) son uno al menos independientemente operable y cooperativamente operable.
13. El sistema de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, en donde al menos una de dichas cámaras y/o biorreactores (202) están conectados operativamente para proporcionar el intercambio de uno o más fluidos, células y tejidos durante el uso.
- 25
14. El sistema de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13, en donde dichos dos o más cámaras y/o biorreactores (202) son operables en paralelo y/o en serie.
15. El sistema de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 14, en donde dicho sistema comprende además uno o más sensores (132, 134) adecuados para monitorizar, durante el uso, los parámetros relacionados con dichas funciones celulares fisiológicas y/o la generación de poblaciones celulares y/o constructos de tejido en dicho modo de procesamiento secuencial y/o concurrente.
- 30
16. El sistema de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 15, en donde durante el uso, dicho sistema realiza y/o proporciona uno o más de lo siguiente:
- recepción/almacenamiento estéril de biopsia de tejido;
  - mezcla y suministro automatizados de reactivos de digestión;
  - monitorización de un proceso de digestión;
  - digestión de tejido de biopsia para producir células desasociadas;
  - clasificación y selección de células;
  - siembra de células sobre o dentro de un sustrato o andamio de proliferación;
  - mezcla y suministro de reactivos de proliferación;
  - proliferación de células para aumentar las poblaciones de células;
  - monitorización de las condiciones celulares;
  - detección de confluencia;
  - liberación controlada desde un sustrato o andamio de proliferación;
  - lavado de células y recogida de células;
  - siembra de células sobre o dentro de un andamio o matriz de ingeniería de tejidos;
- 35
- 40
- 45

- mezcla y suministro de reactivos de diferenciación;
  - monitorización de las condiciones de cultivo de células/tejidos;
  - diferenciación celular para permitir la especialización de la actividad celular;
  - formación de tejido;
- 5
- estimulación mecánica y/o bioquímica para promover la madurez tisular;
  - recogida de residuos;
  - recogida de los constructos/implantes de ingeniería de tejidos; y
  - almacenamiento y transporte de células y/o tejido.

# Ingeniería de Tejidos Clínica

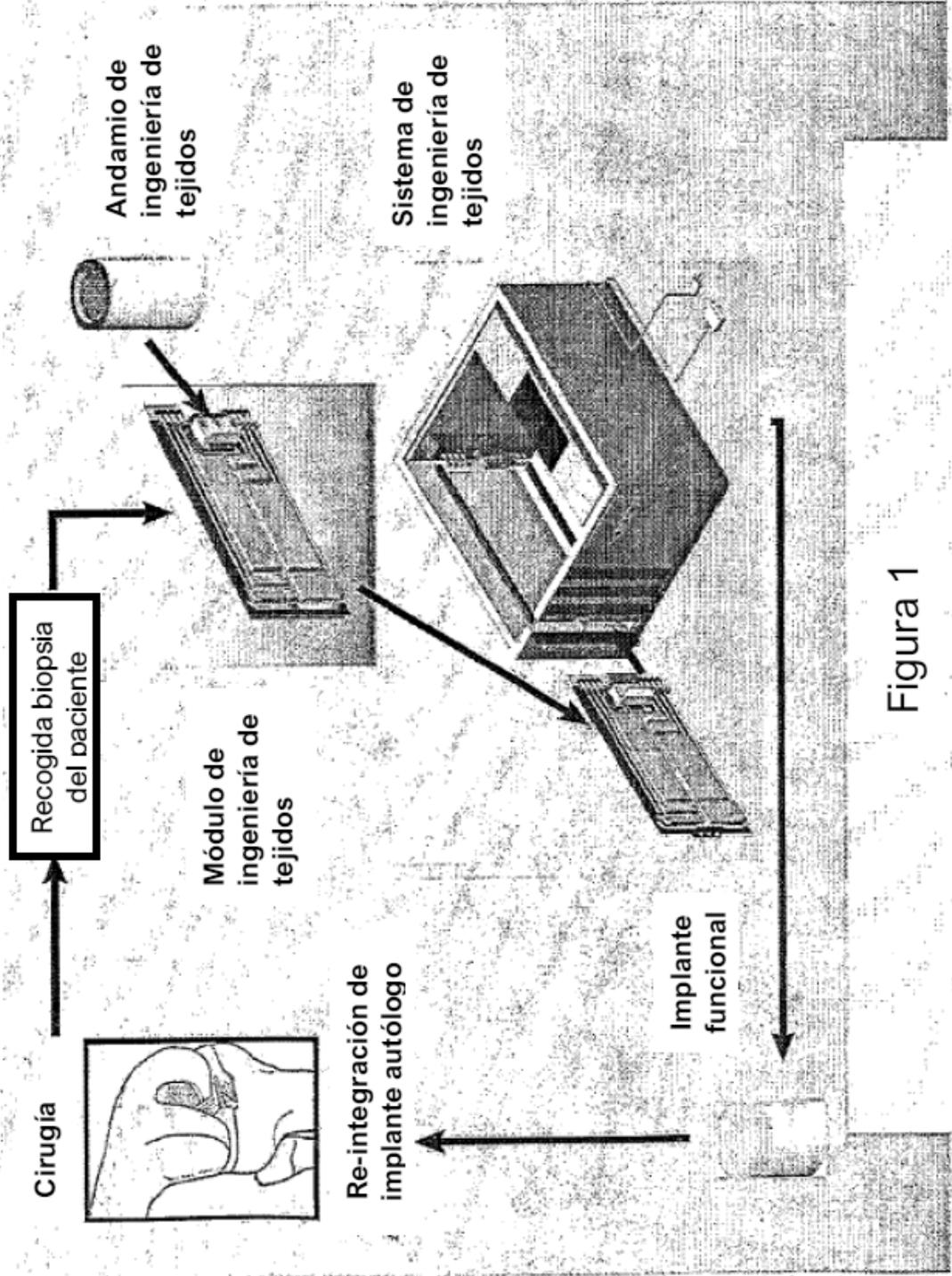


Figura 1

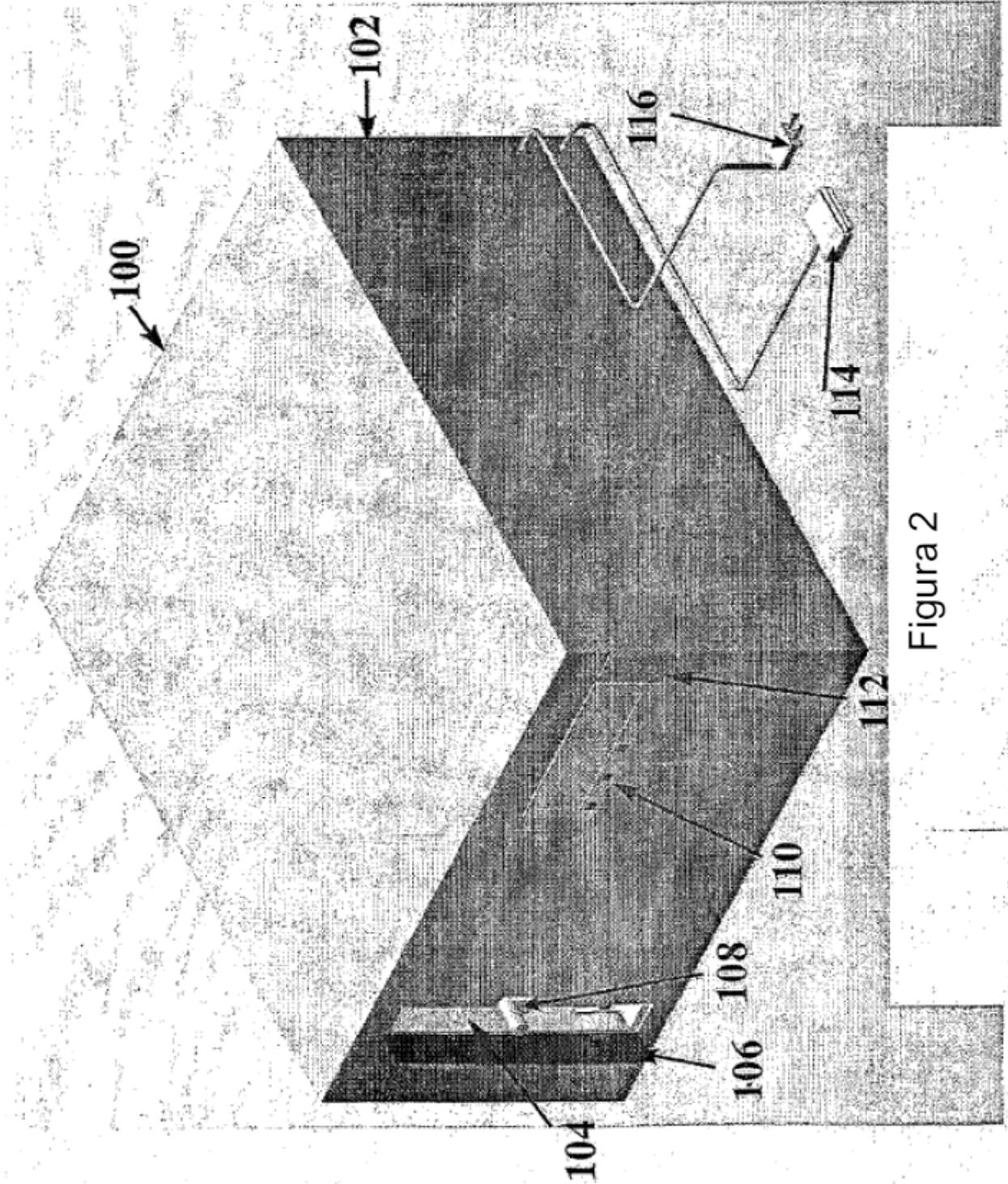
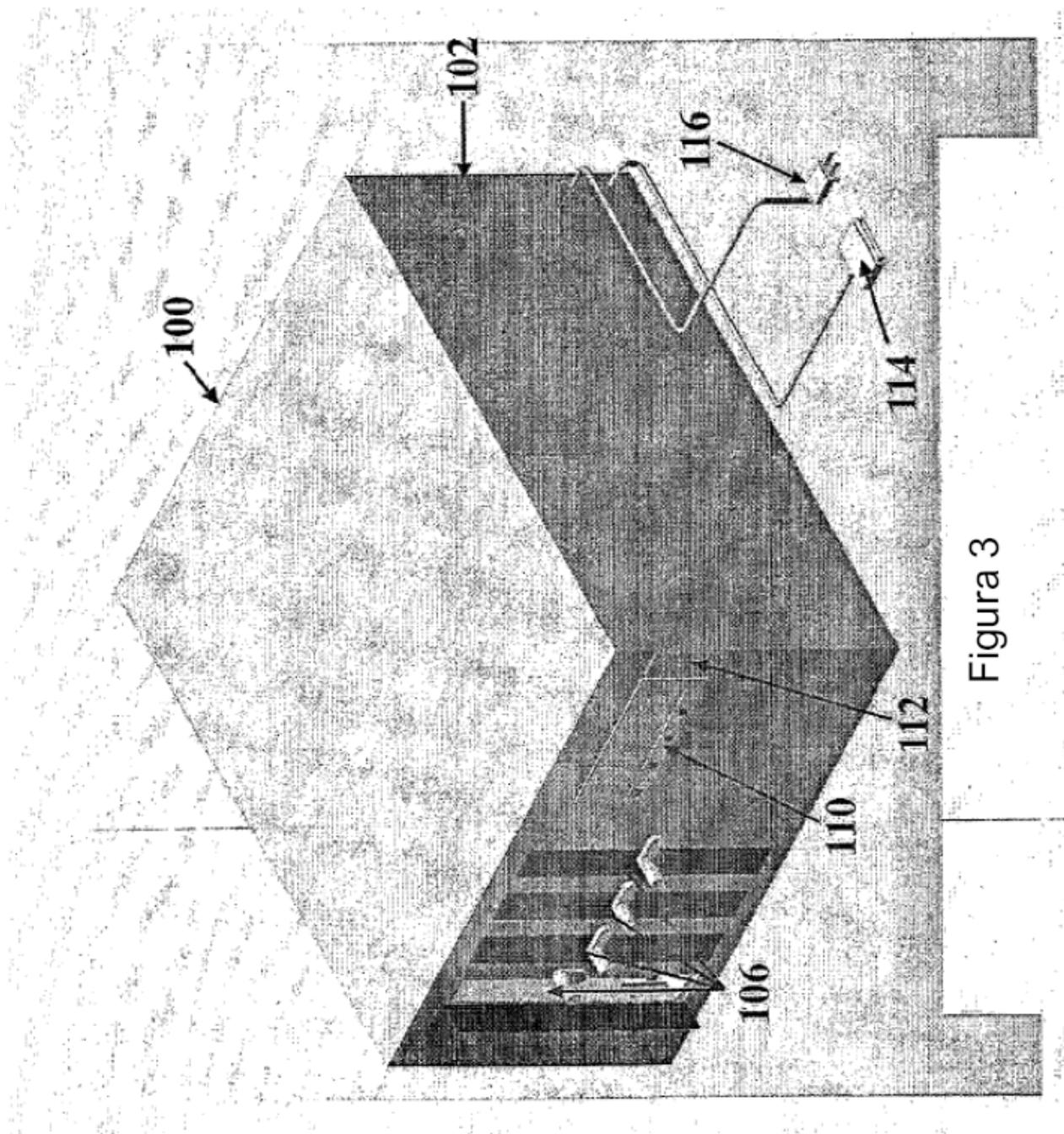


Figura 2



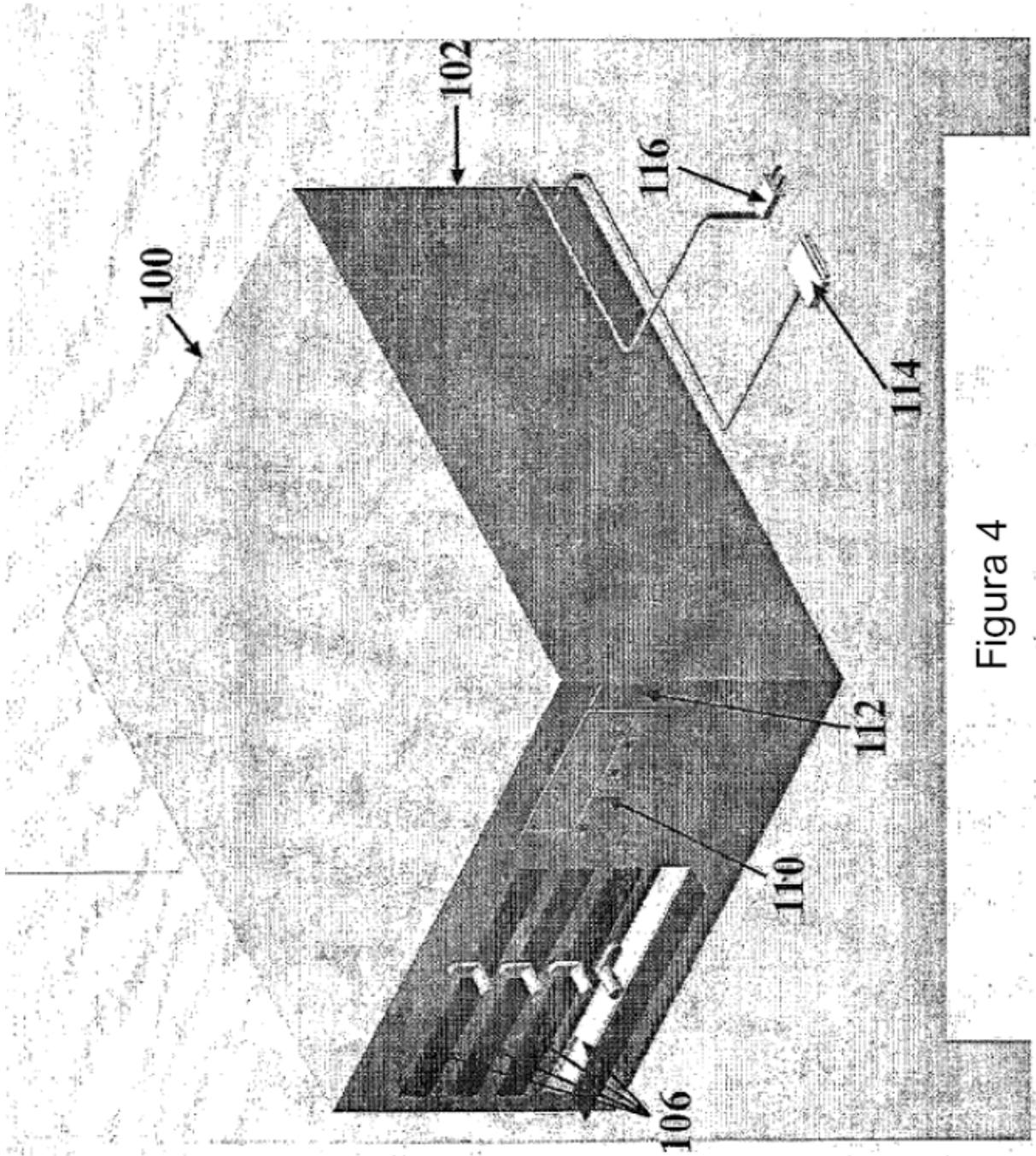


Figura 4

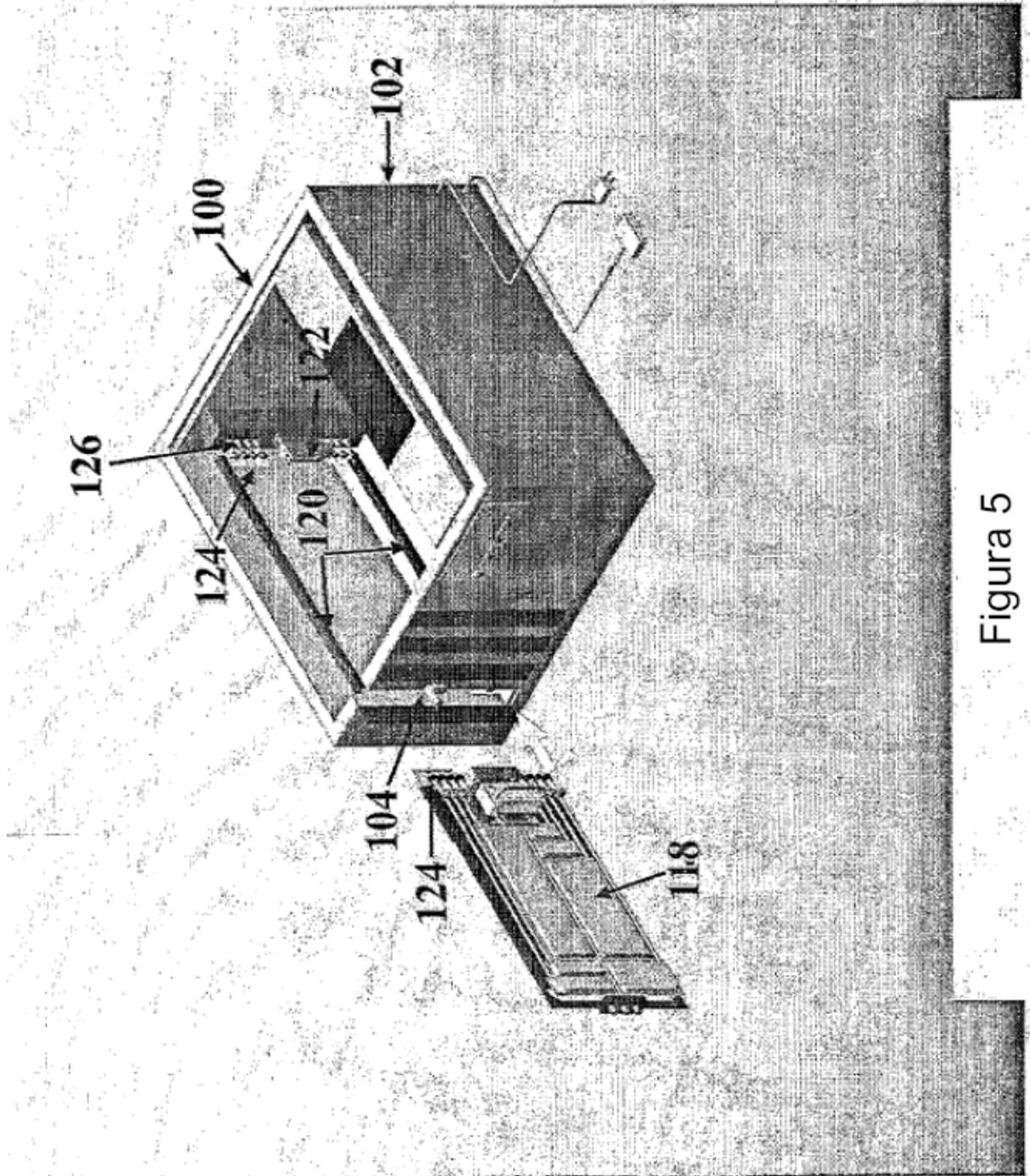


Figura 5

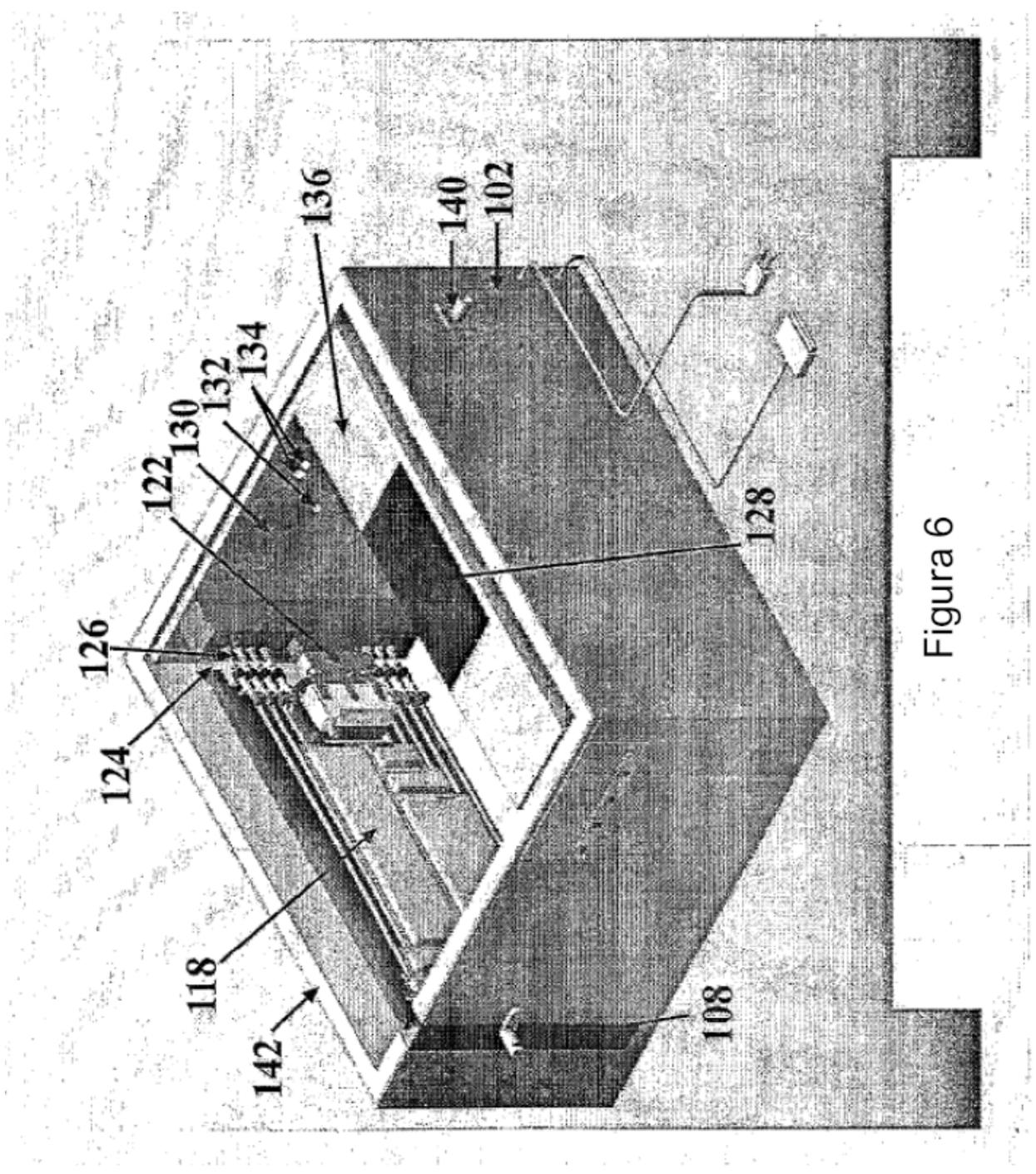


Figura 6

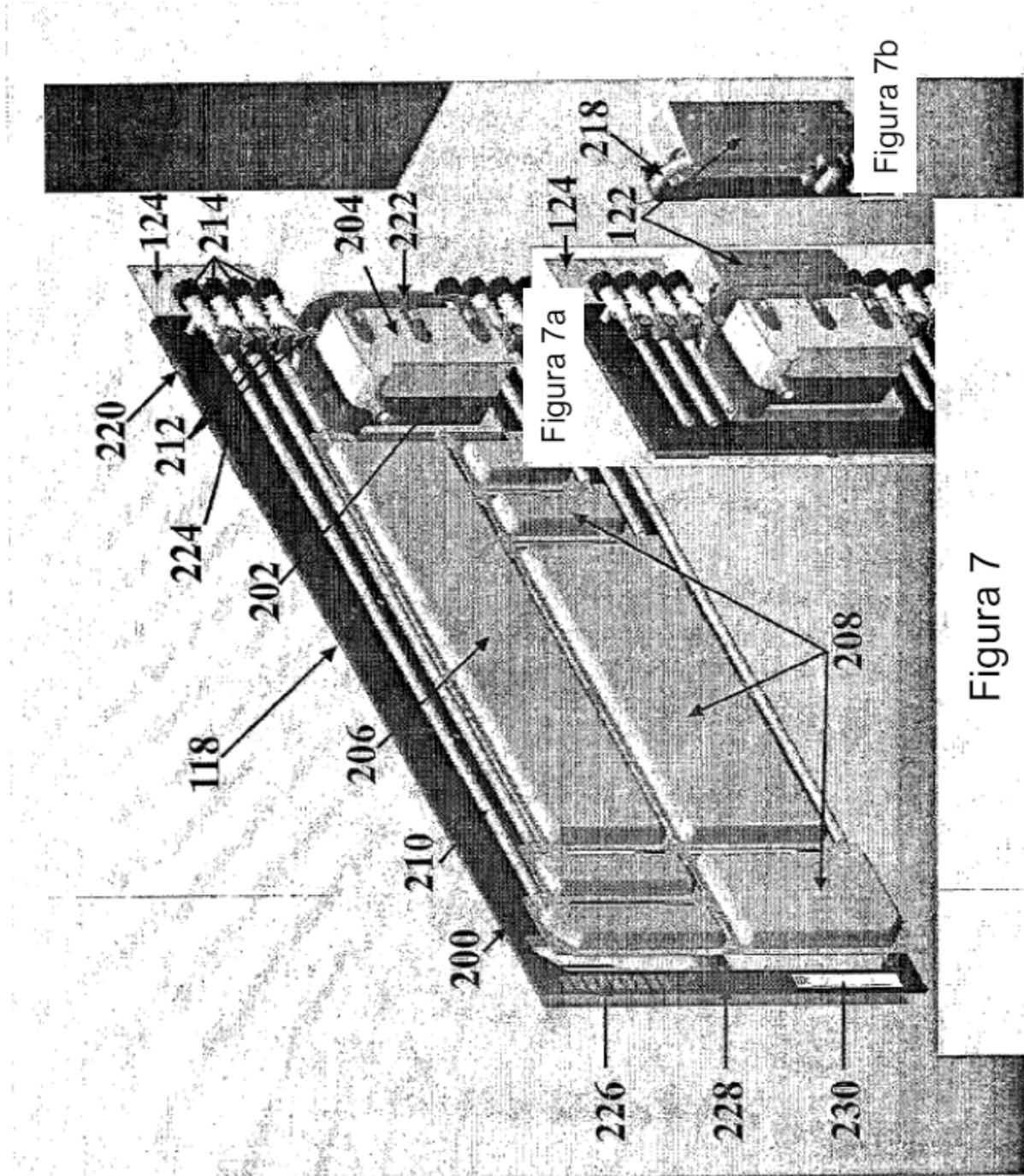
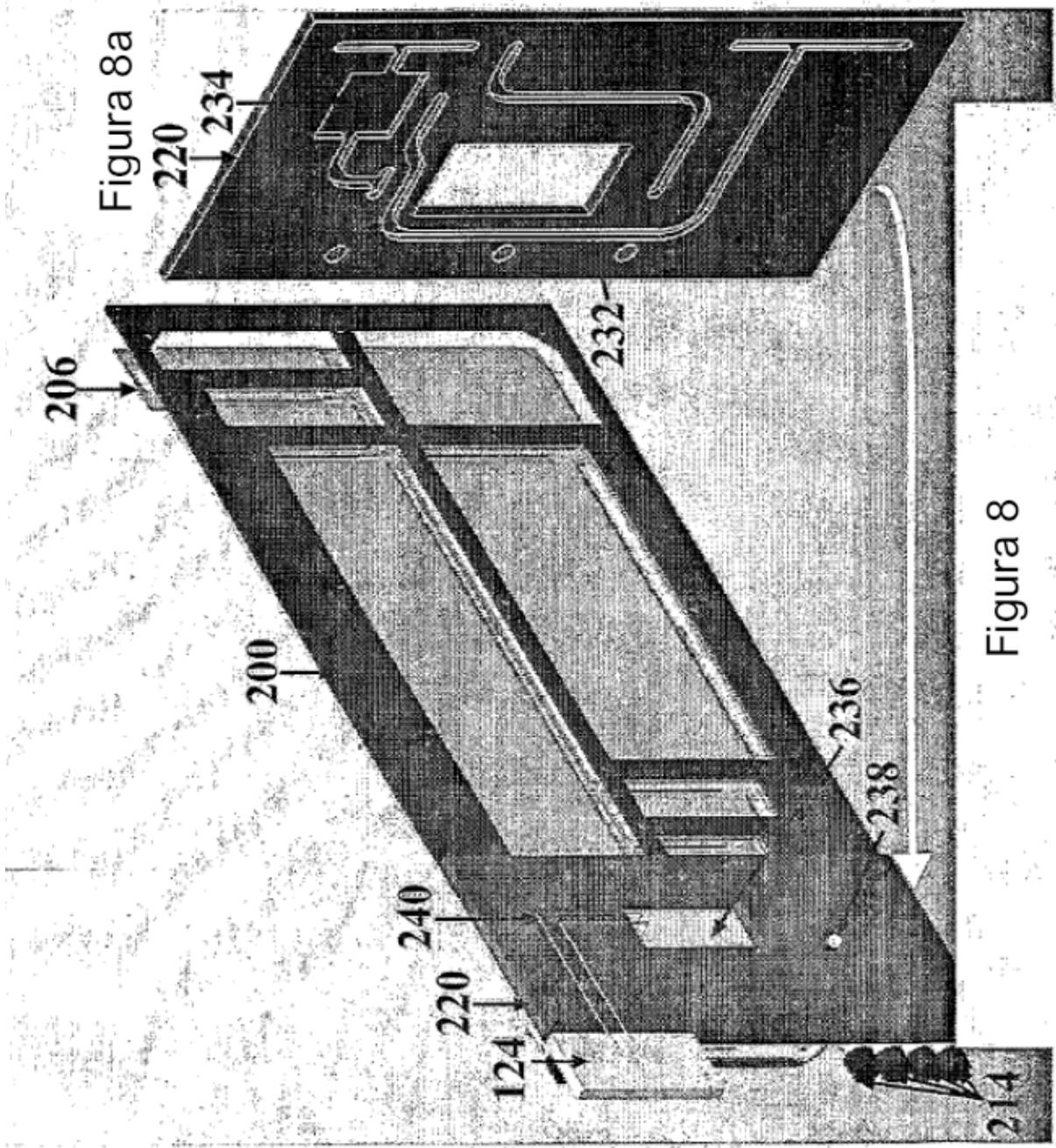


Figura 7

Figura 7b

Figura 7a



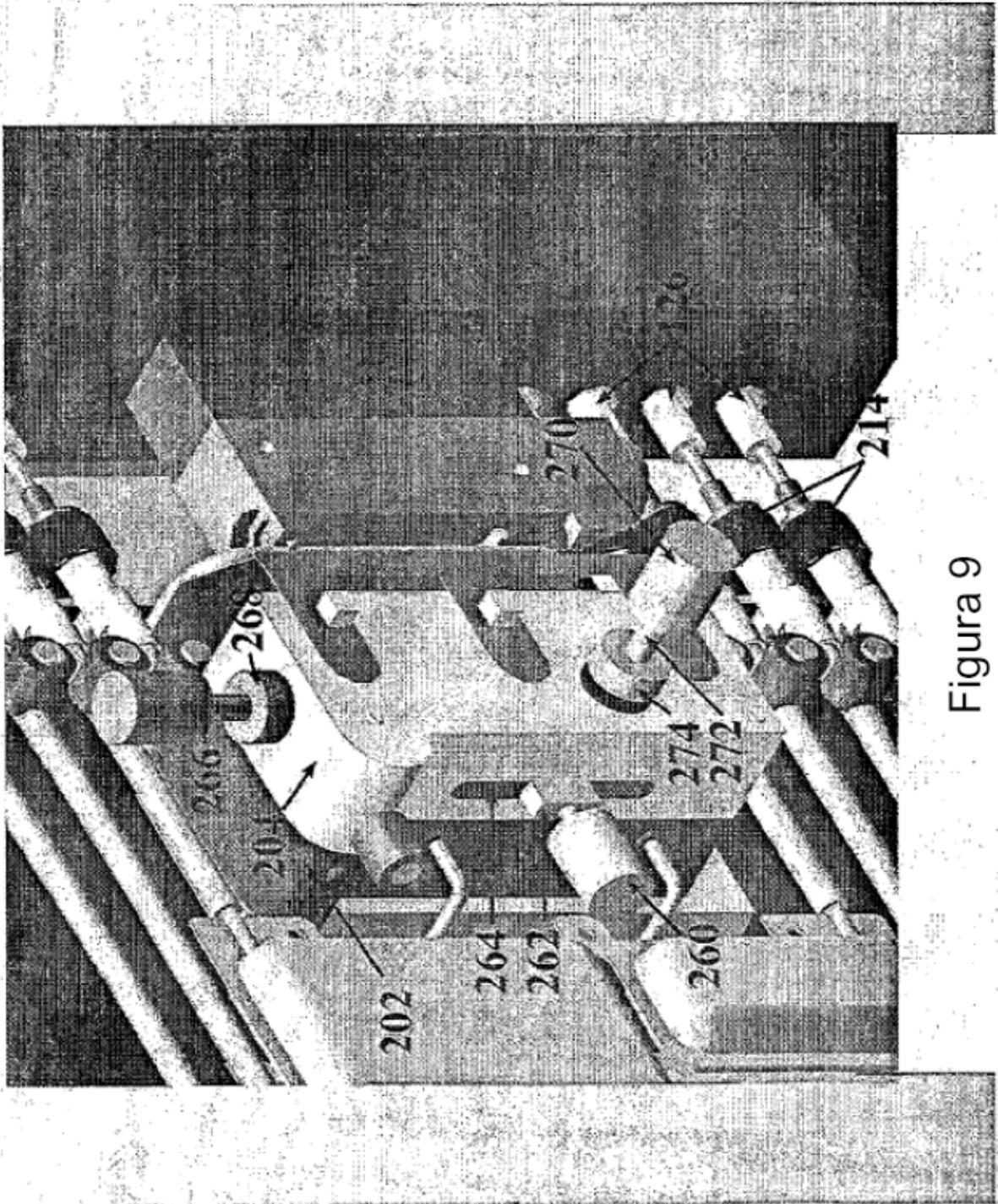


Figura 9

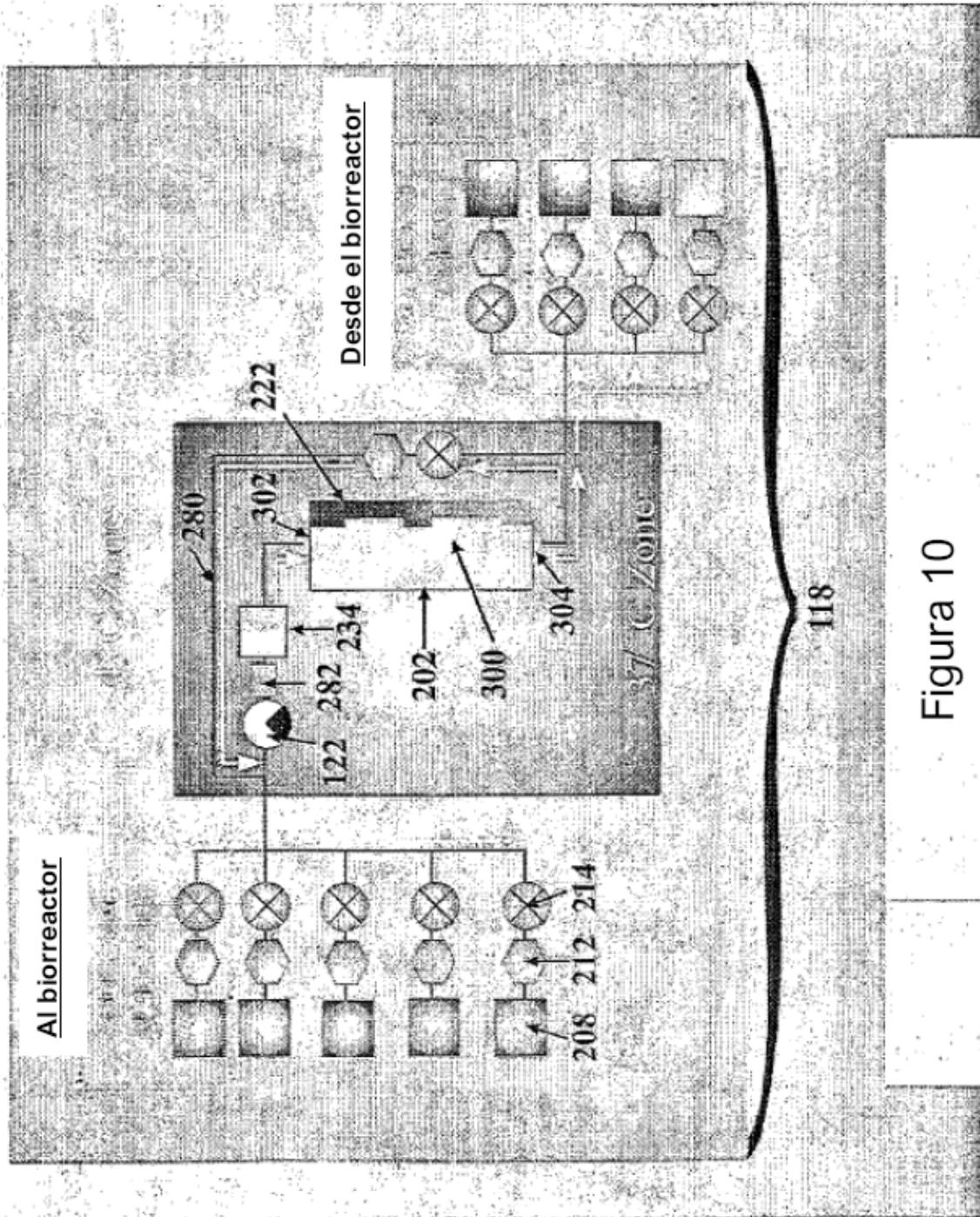


Figura 10

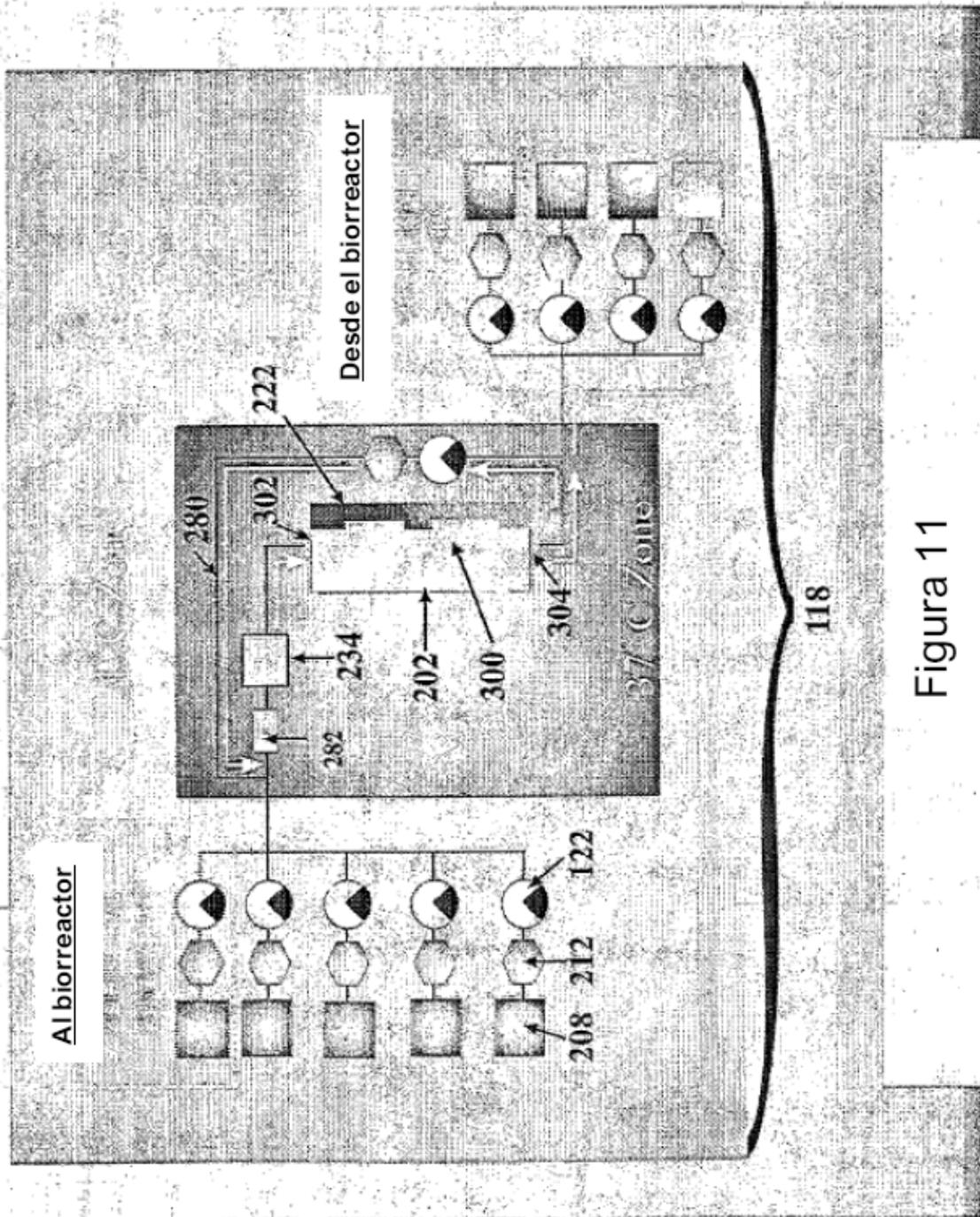
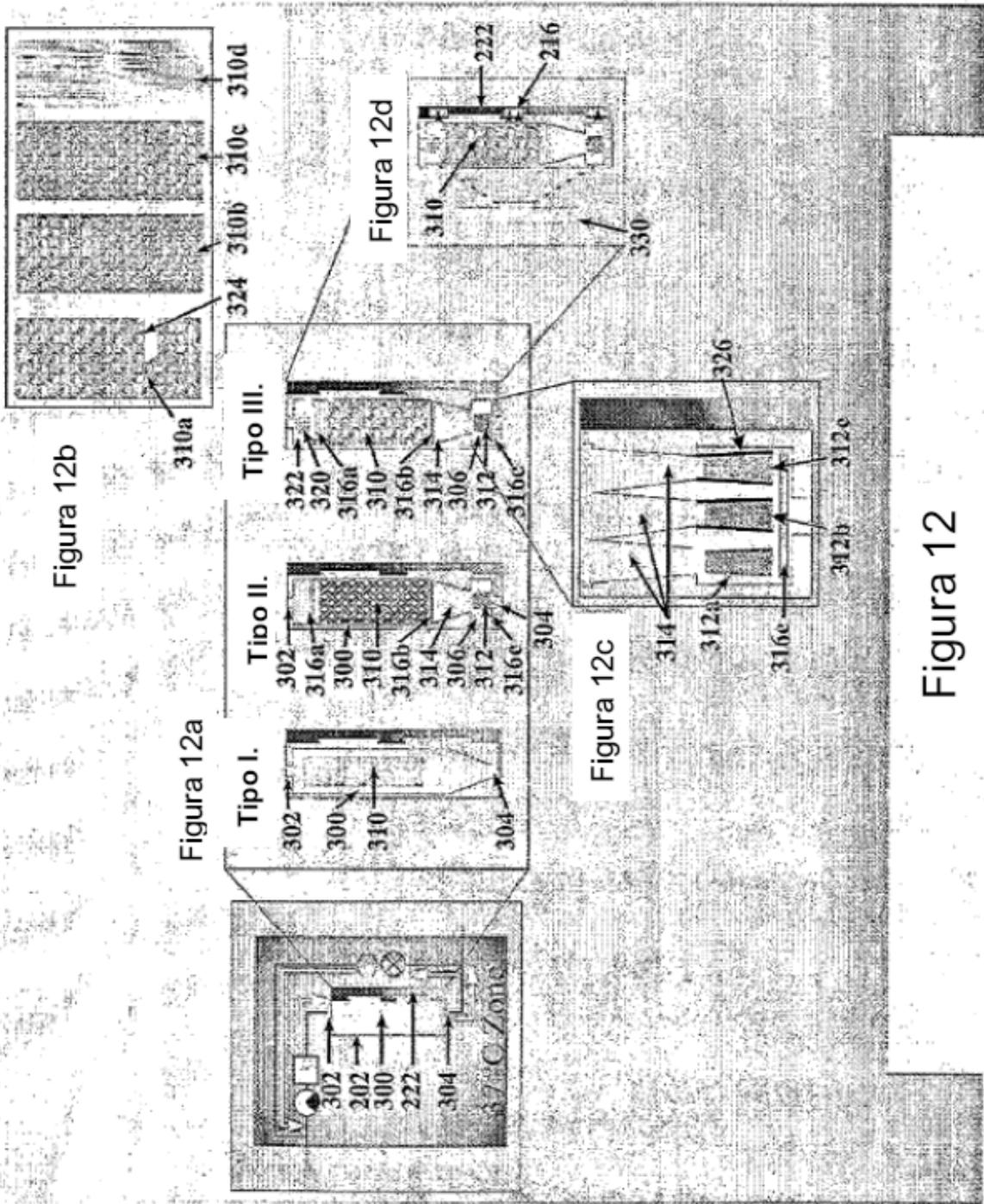


Figura 11



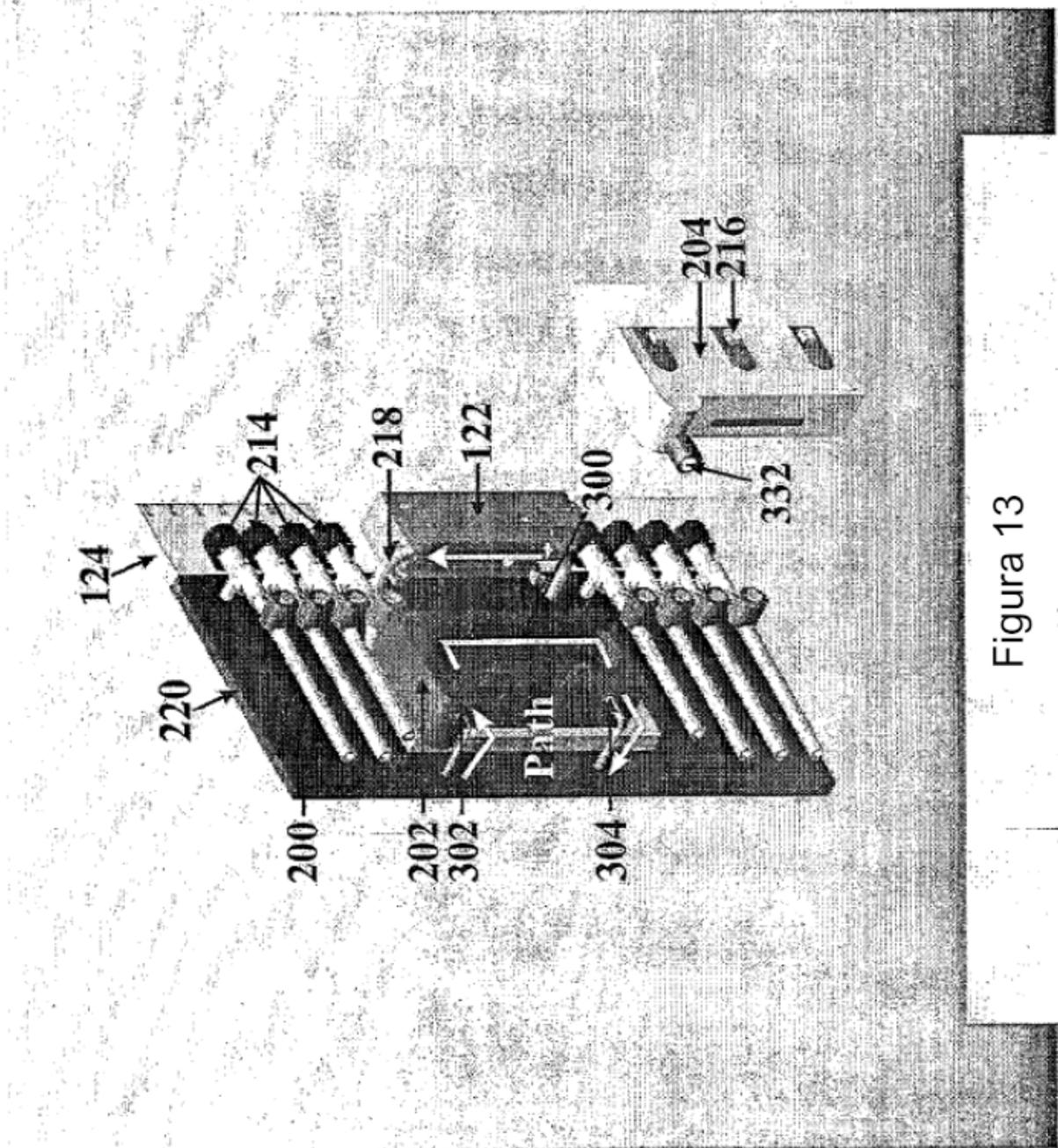


Figura 13

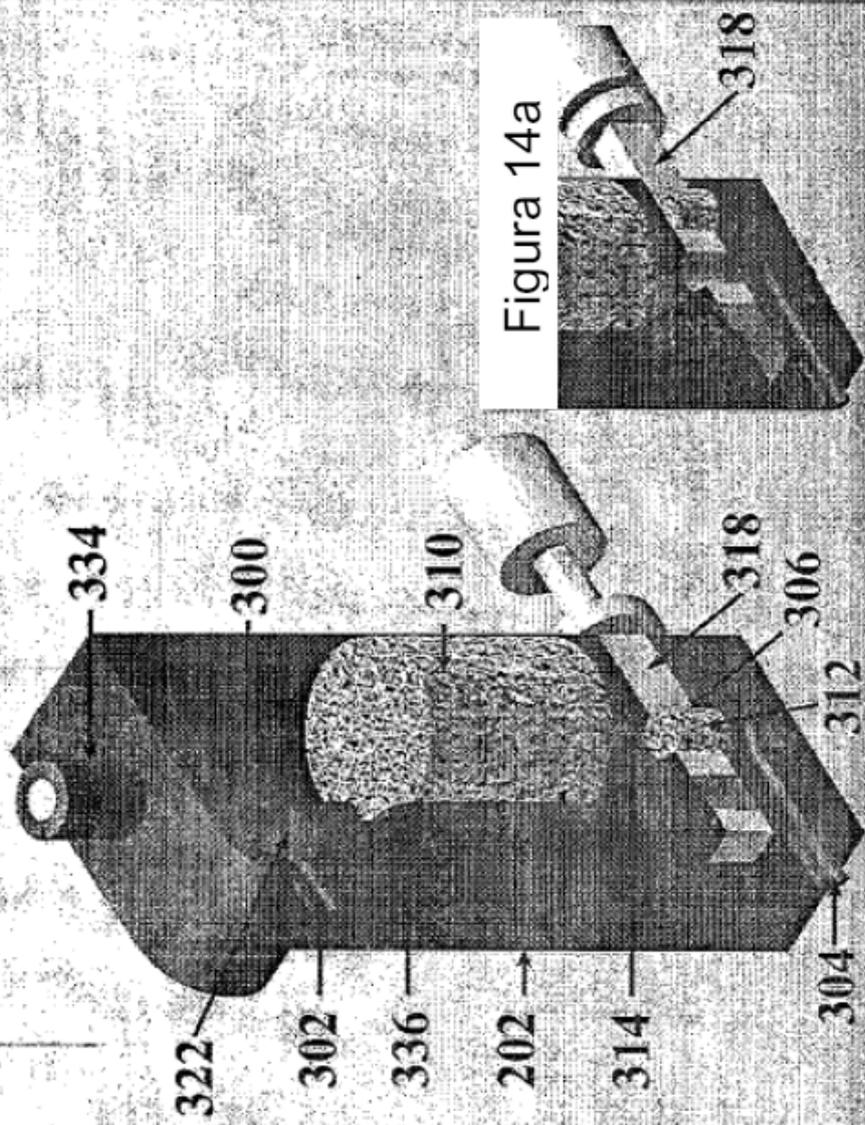


Figura 14

Figura 15a. Superficie de siembra inicial

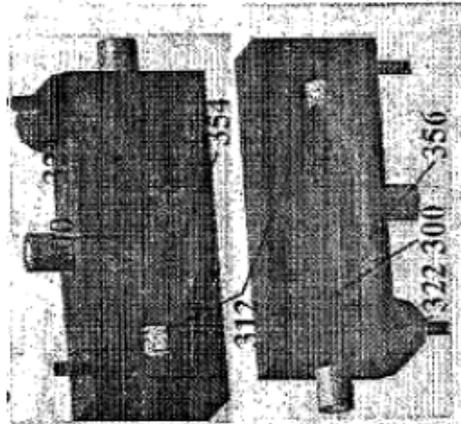


Figura 15b. Superficie de proliferación más grande

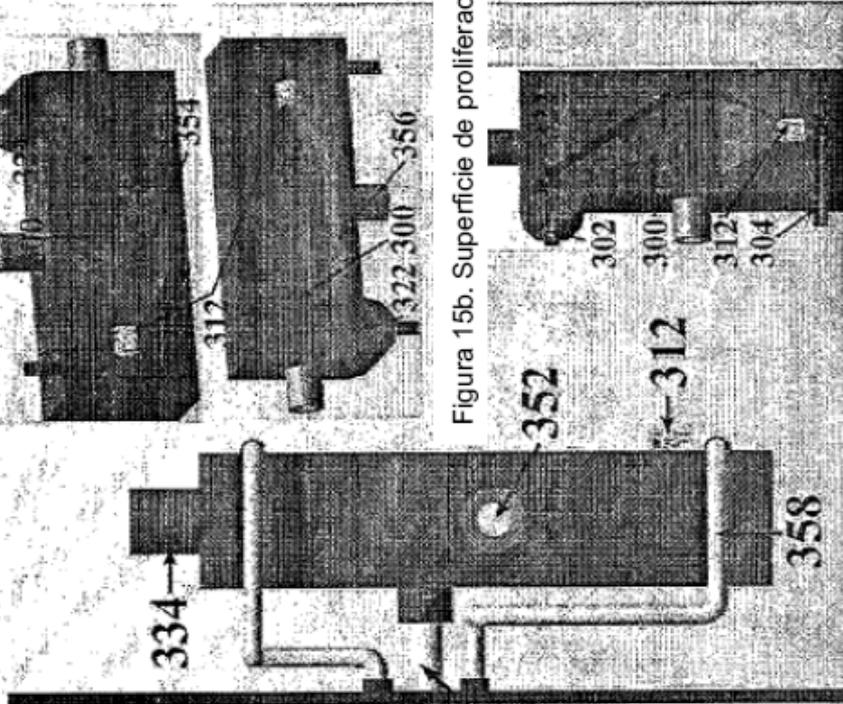
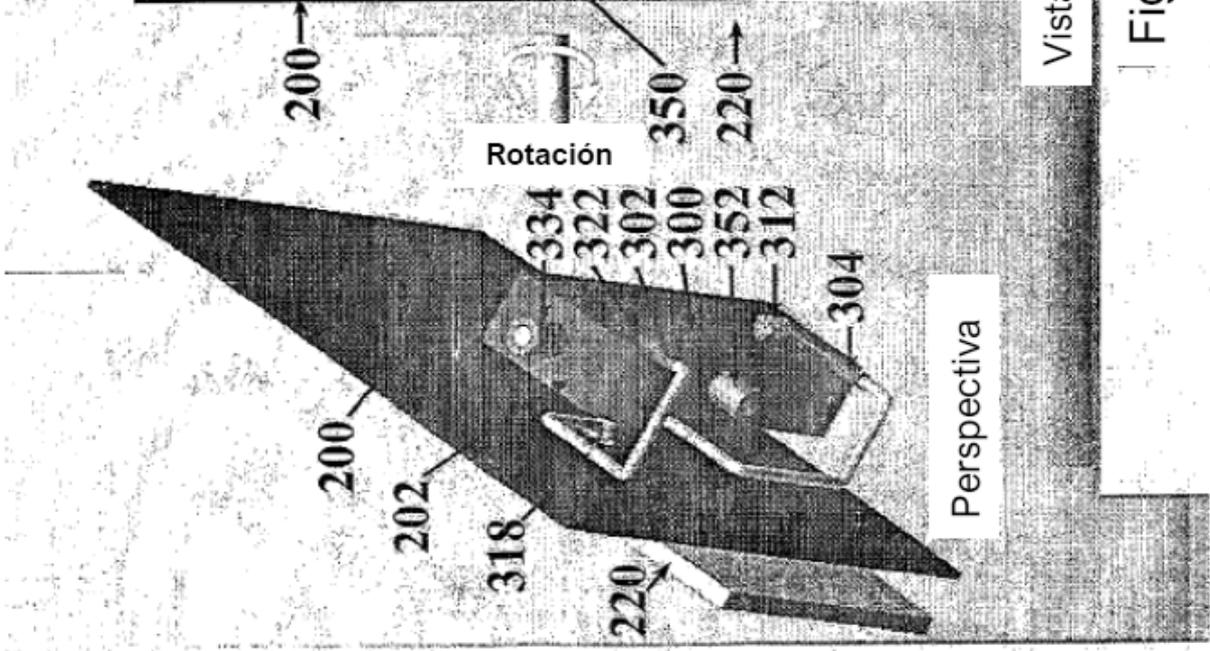


Figura 15c. Siembra de implante



Vista lateral

Posiciones

Figura 15

Perspectiva

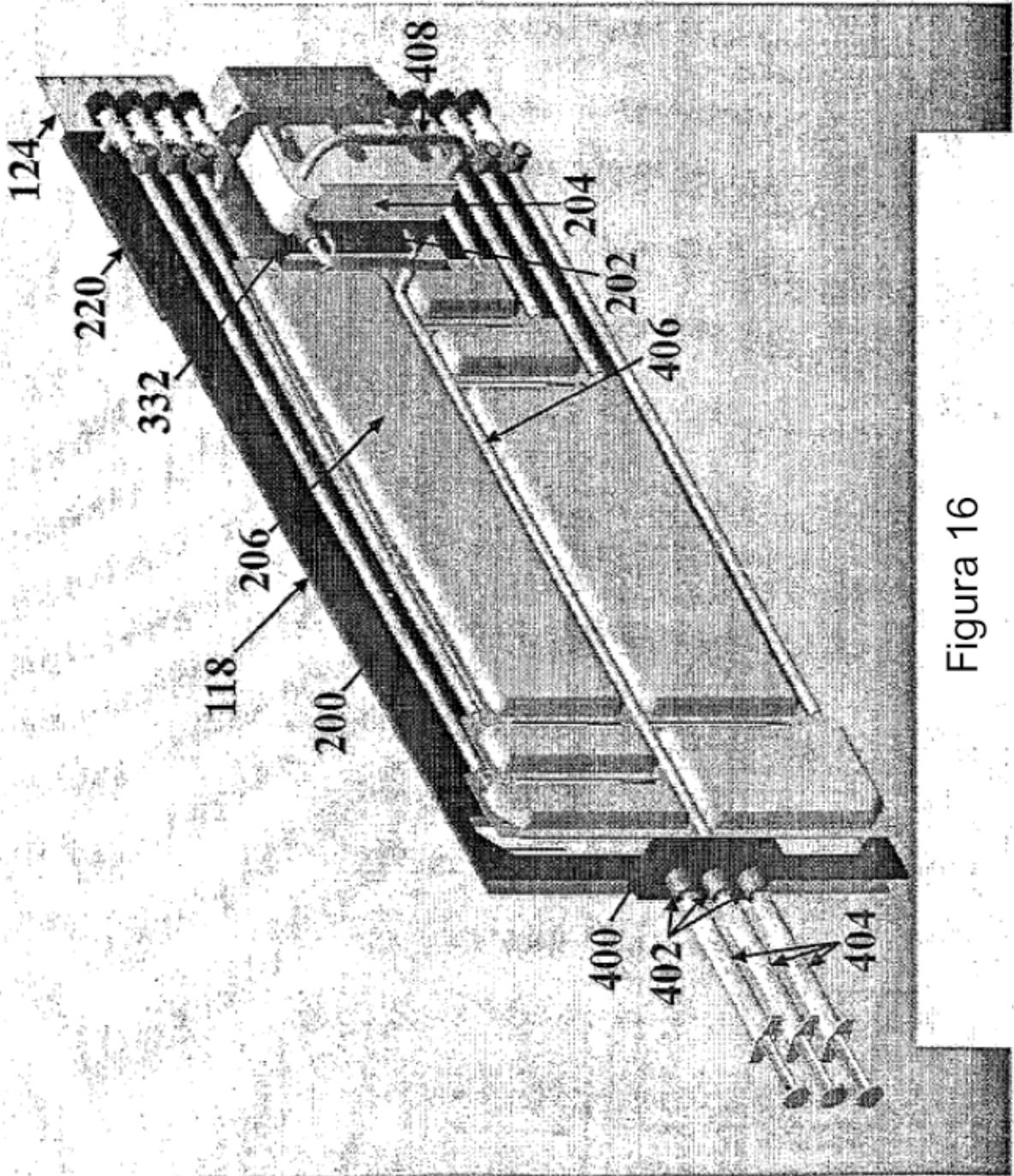


Figura 16

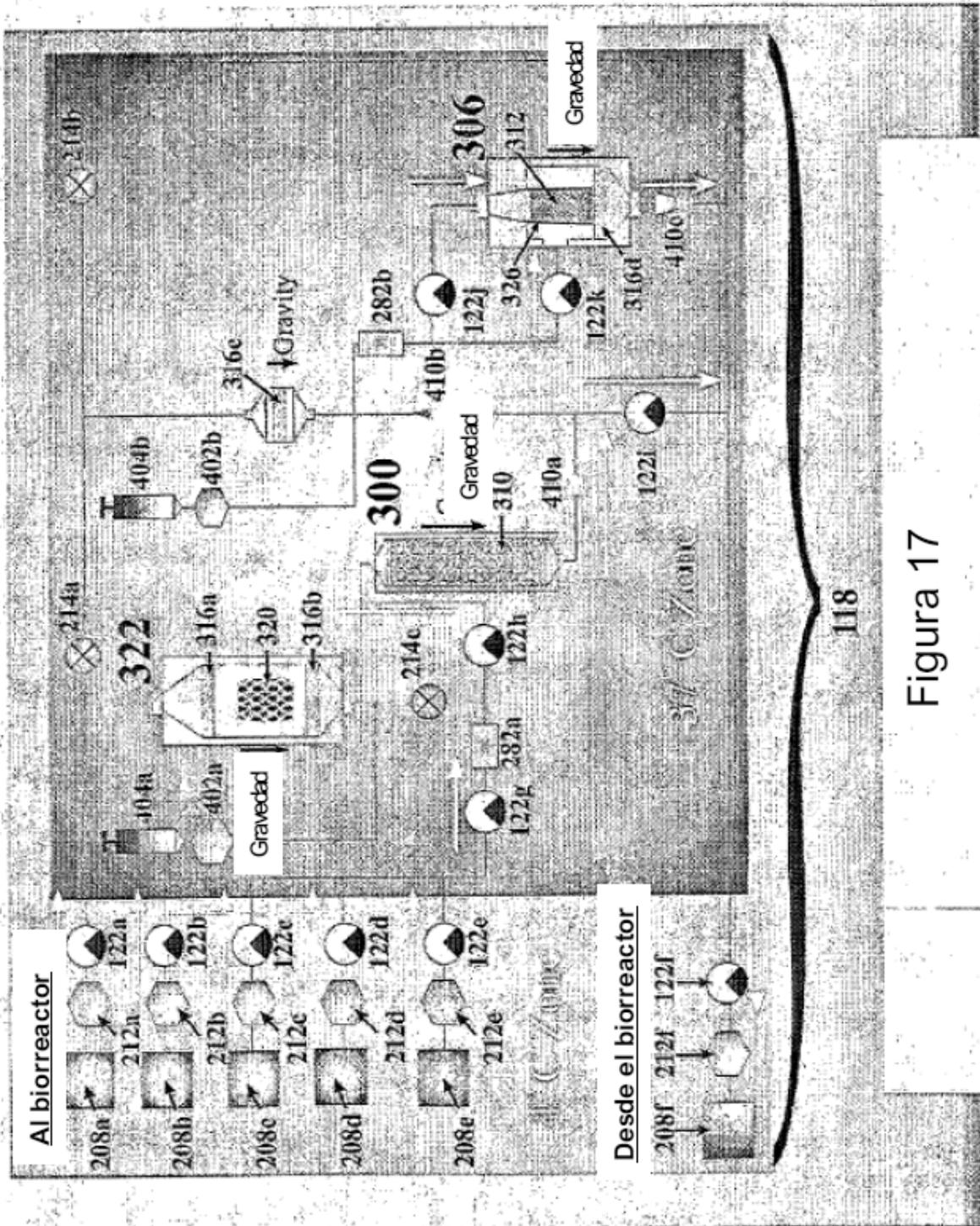


Figura 17

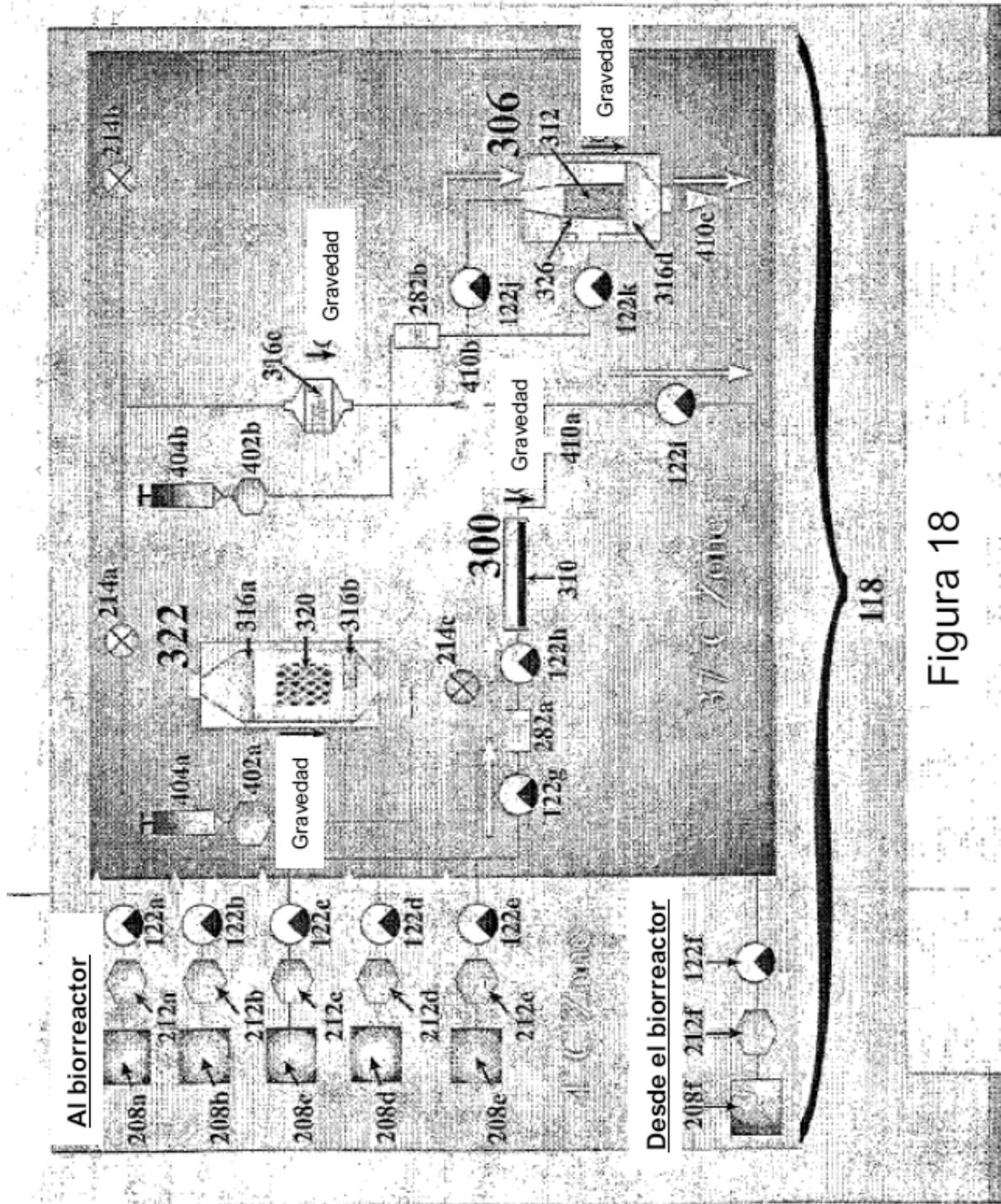


Figura 18

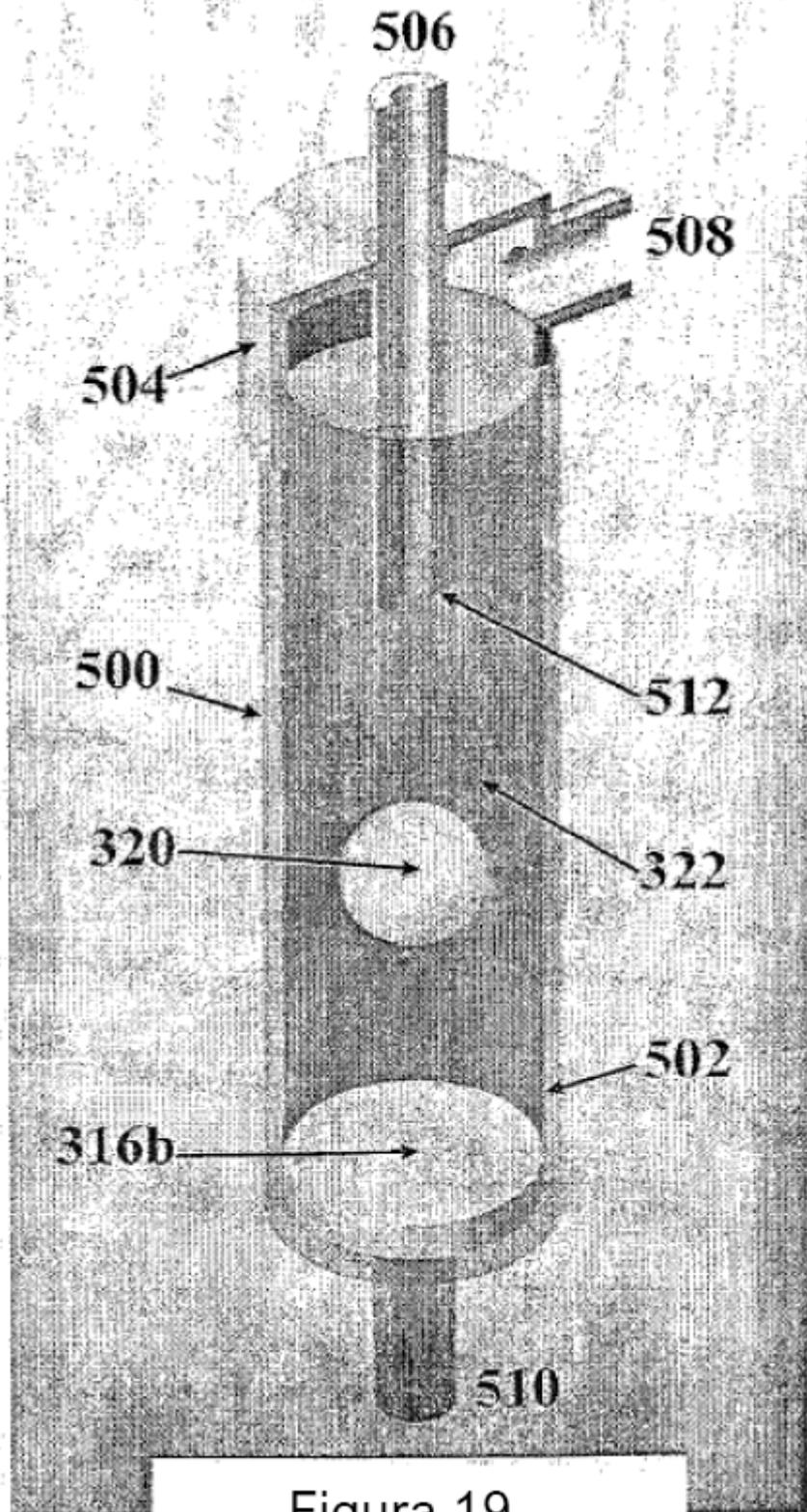


Figura 19

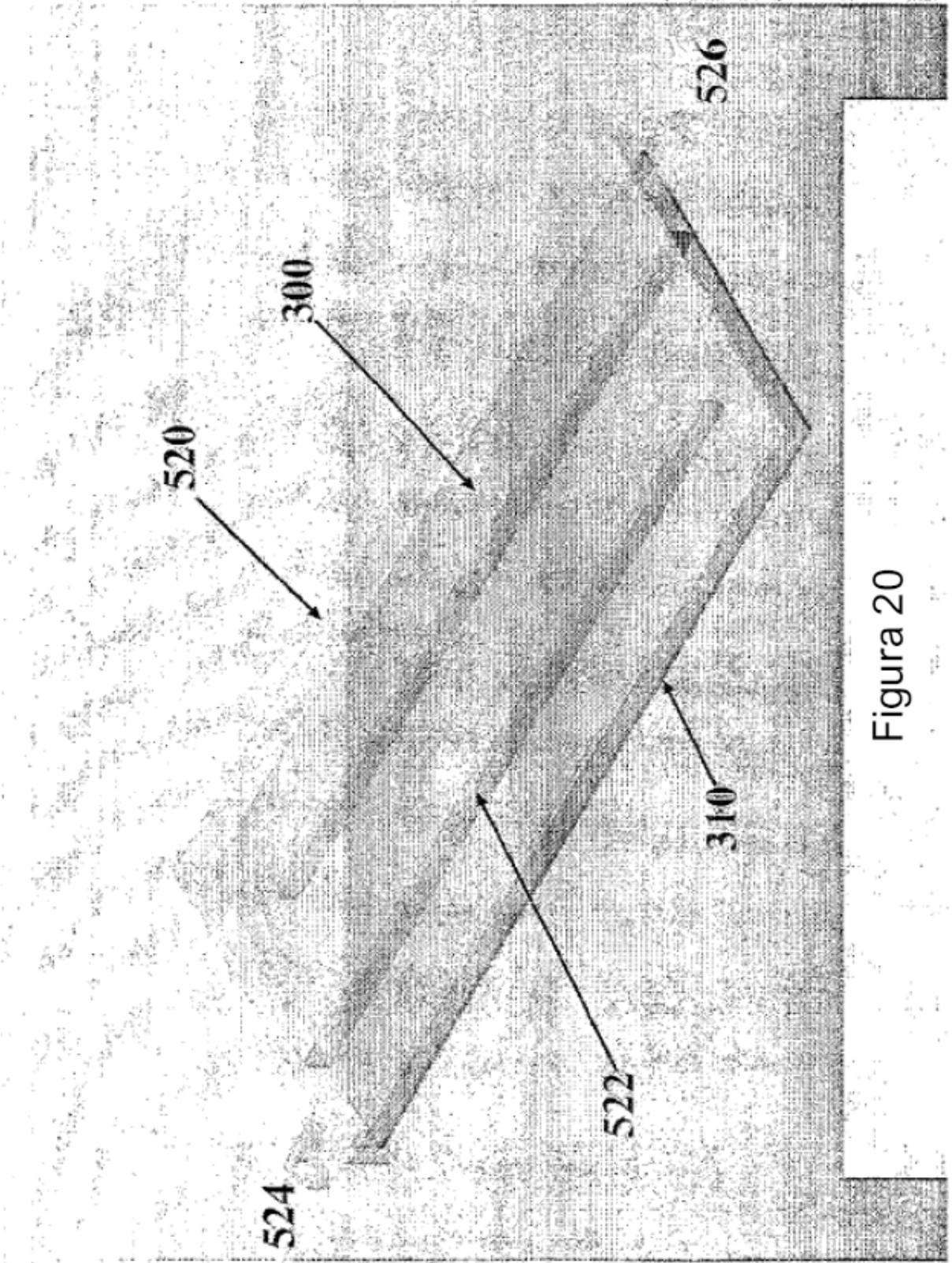


Figura 20

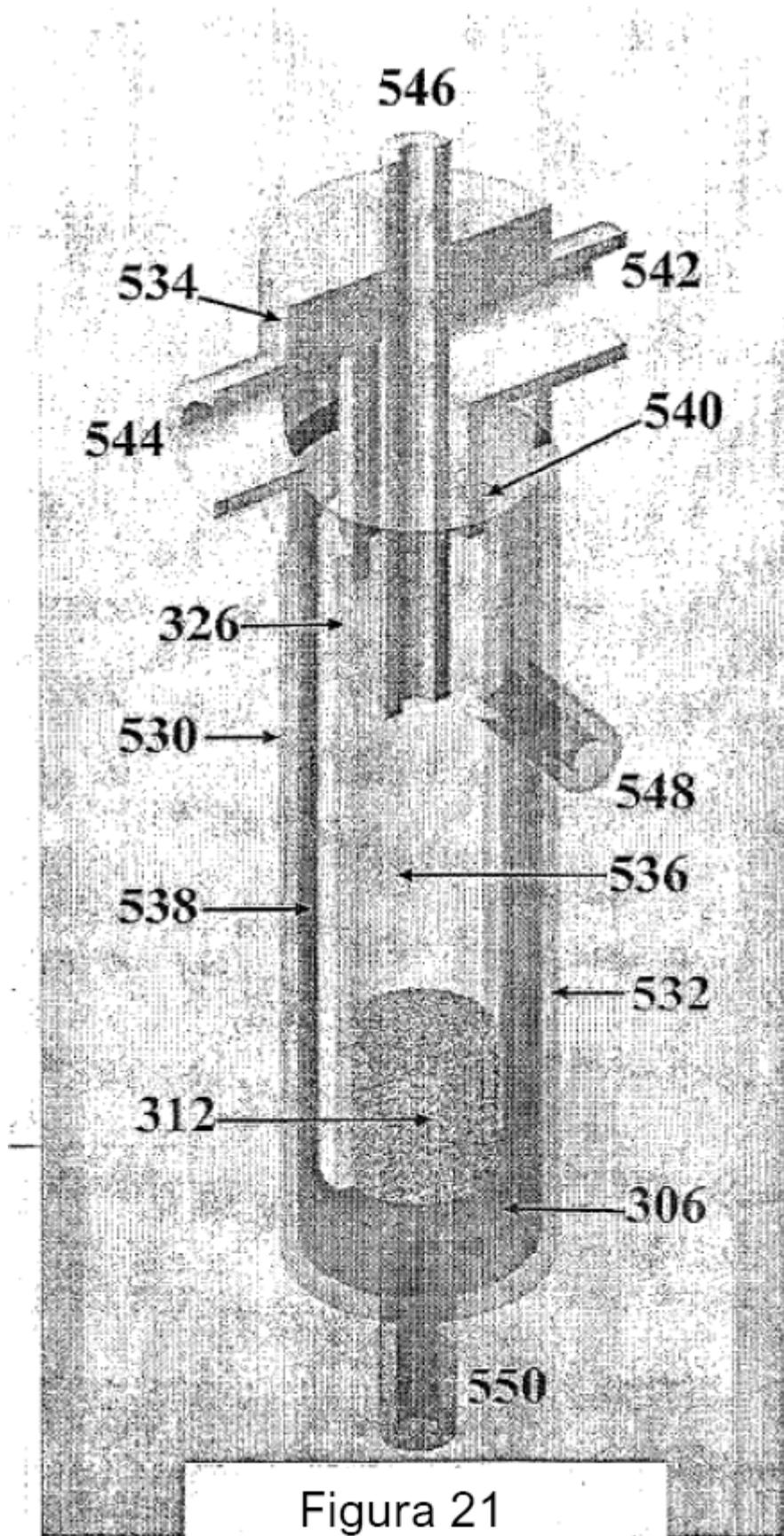


Figura 21

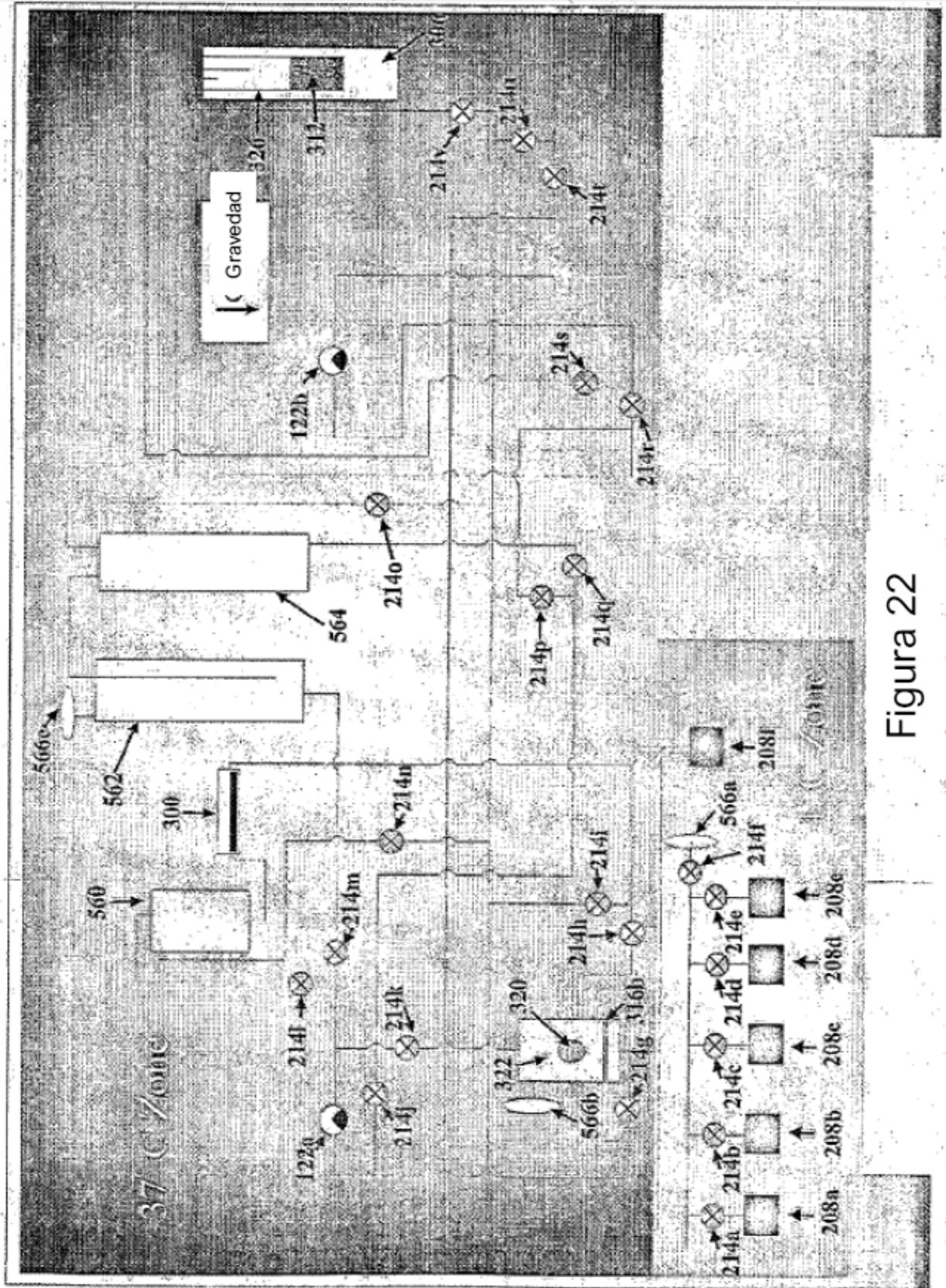


Figura 22

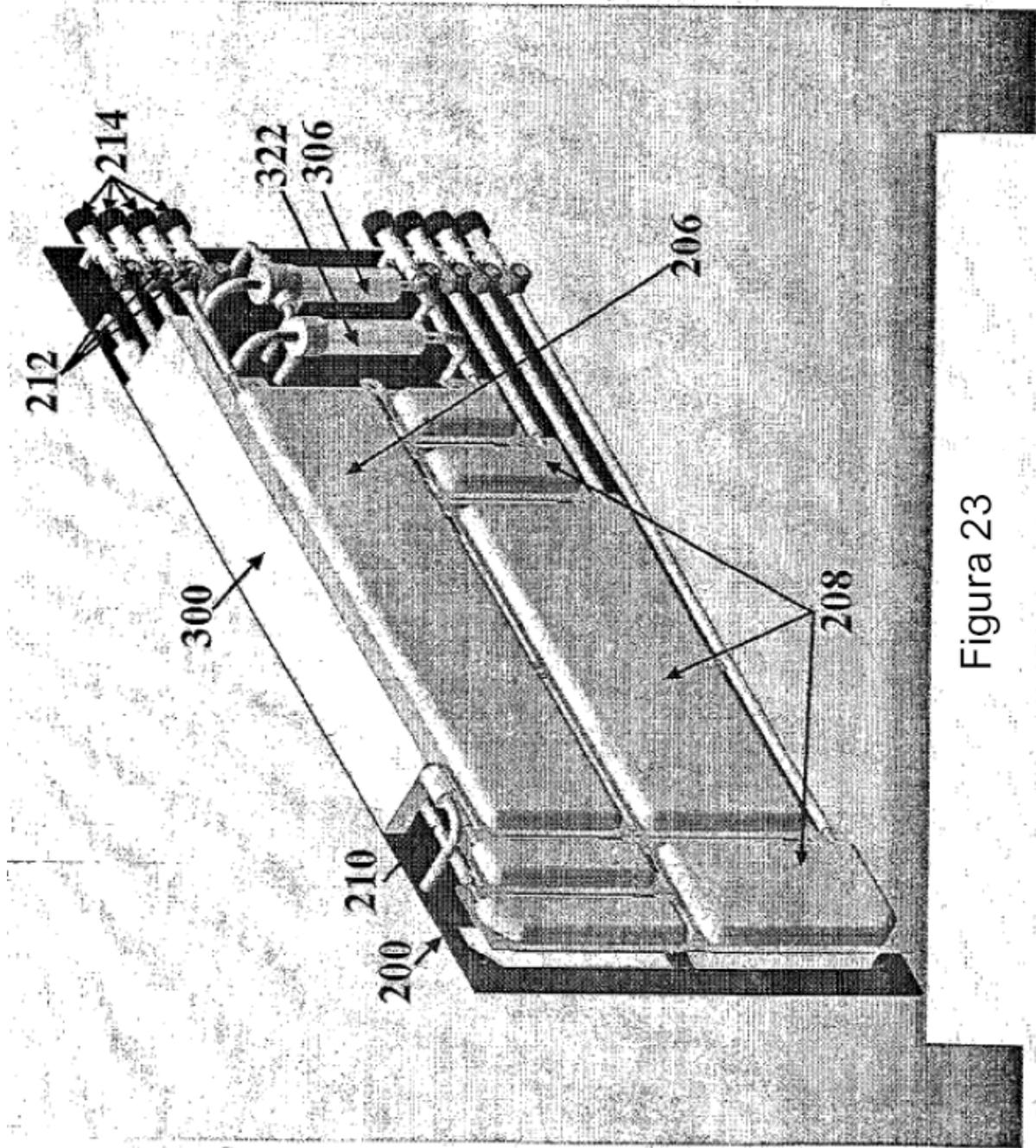


Figura 23