

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 719 779**

51 Int. Cl.:

A61F 2/24 (2006.01)
C12N 5/077 (2010.01)
A61L 27/50 (2006.01)
A61L 27/38 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01)
C12M 1/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.12.2013 PCT/US2013/072779**
87 Fecha y número de publicación internacional: **12.06.2014 WO14089023**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2013 E 13811696 (7)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2019 EP 2931179**

54 Título: **Proceso para cultivar una válvula cardíaca en tres dimensiones**

30 Prioridad:

03.12.2012 US 201261732669 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.07.2019

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)
1111 Franklin Street, 12th Floor
Oakland, CA 94607-5200, US**

72 Inventor/es:

**ALAVI, SEYEDHAMED y
KHERADVAR, ARASH**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 719 779 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

Proceso para cultivar una válvula cardíaca en tres dimensiones

Antecedentes de la invención**Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere a un método para cultivar válvulas cardíacas in vitro y, más particularmente, a un proceso para conformar y fijar células y capas de tejido a medida que se cultivan en tres dimensiones en una válvula cardíaca.

Descripción de la técnica relacionada

- 10 Las válvulas cardíacas con componentes integrales de la función y salud vascular. Se requiere que una válvula cardíaca sana permita que la sangre fluya en una única dirección a través de las diversas cámaras del corazón. Una válvula cardíaca natural puede deteriorarse o volverse disfuncional por una variedad de razones, lo que, como se puede apreciar, requiere acción para que la persona mantenga la salud y la vida. Por ejemplo, las válvulas biológicas o de tejido se hacen típicamente de válvulas cardíacas de cerdo y se pueden implantar quirúrgicamente para sustituir la válvula cardíaca natural que falla. Aunque son funcionalmente operables, tales válvulas cardíacas de cerdo
15 requieren la sustitución con el tiempo y están sujetas al rechazo del cuerpo del paciente.

- Como tal, es deseable que los reemplazos de válvulas cardíacas se asemejen más a la válvula cardíaca humana y, si es posible, se formen de tejido que reducirá la probabilidad de rechazo corporal. Aunque es óptimo generar una válvula cardíaca con las células y capas de tejido apropiadas, generar tal válvula puede ser problemático. Por tanto, existe una necesidad continua de un aparato para conformar y fijar las células y capas de tejido a medida que se cultivan en tres dimensiones en una válvula cardíaca.
20

El documento de la técnica anterior US6666886 B1 describe un método para cultivar una válvula cardíaca in situ en el que una disolución de colágeno que comprende células se inyecta en un molde para formar un esqueleto de biopolímero autoensamblado con células de tejido atrapadas.

- 25 El documento US2002/111676 A1 describe un método para cultivar una válvula cardíaca en el que se ensambla un molde, se llena con una matriz y donde después de la formación de un revestimiento de colágeno se retira una parte del molde y se siembra la valva con una suspensión celular.

El documento US2012244617 A1 describe un método para sembrar una matriz de valva de válvula cardíaca con tres capas de células.

Compendio de la invención

- 30 La presente invención está definida por las reivindicaciones adjuntas y se refiere a un proceso para conformar y fijar células y capas de tejido a medida que se cultivan en tres dimensiones en una válvula cardíaca. Por ejemplo, se describe un aparato para cultivar una válvula cardíaca in vitro, que comprende una primera parte y una segunda parte. La primera parte incluye una protuberancia en forma de válvula cardíaca con una pluralidad de cúspides que se forman para imitar la forma de una valva de válvula cardíaca, mientras que la segunda parte incluye huecos que se forman para recibir la protuberancia en forma de válvula cardíaca.
35

En otro aspecto, al menos una de la primera y segunda partes incluye un orificio de inyección que pasa a través de la misma.

- 40 En otro aspecto más, se incluye un esqueleto para su posicionamiento entre la primera y segunda partes, siendo capaz el esqueleto de soportar formaciones de tejido tridimensionales. El esqueleto se selecciona de un grupo que consiste en una malla metálica y una disolución de gel/líquido. Adicionalmente, como un ejemplo no limitativo, la primera y segunda partes se forman de Poliéter éter cetona (PEEK).

Adicionalmente y en otro aspecto, el hueco de la segunda parte tiene una forma ahusada.

- 45 En otro aspecto más, se describe un método para cultivar una válvula cardíaca in vitro. El método incluye varias acciones, tal como posicionar un esqueleto entre una primera parte y una segunda parte, teniendo la primera parte una protuberancia en forma de válvula cardíaca con una pluralidad de cúspides que se forman para imitar la forma de una valva de válvula cardíaca y teniendo la segunda parte un hueco que se forma para recibir la protuberancia en forma de válvula cardíaca. Posteriormente, la primera y segunda partes se cierran alrededor del esqueleto de tal manera que el esqueleto queda encerrado dentro de la primera y segunda partes. Una primera disolución de células se introduce a través de un orificio de inyección en el esqueleto. A continuación, la primera disolución de células se
50 incuba hasta que se forma una primera capa de tejido.

En otro aspecto, la primera parte se ajusta con respecto a la segunda parte para crear un espacio alrededor de la primera capa de tejido. Una segunda disolución de células se introduce a través del orificio de inyección en el esqueleto

para encerrar la primera capa de tejido. La segunda disolución de células se incuba hasta que se forma una segunda capa de tejido que rodea la primera capa de tejido.

5 En otro aspecto más, la primera parte se ajusta con respecto a la segunda parte para crear un espacio alrededor de la segunda capa de tejido. Una tercera disolución de células se introduce a través del orificio de inyección en el esqueleto para encerrar la segunda capa de tejido. La tercera disolución de células se incuba hasta que se forma una tercera capa de tejido que rodea la segunda capa de tejido.

En otro aspecto, la primera disolución de células incluye células de músculo liso, la segunda disolución de células incluye células de fibroblastos/miofibroblastos y la tercera disolución de células incluye células endoteliales.

10 Adicionalmente y en otro aspecto más, en la incubación de la tercera disolución de células, la tercera capa de tejido endotelializa los tejidos para formar una válvula cardíaca que es similar a un tejido natural.

En otro aspecto, el esqueleto se selecciona de un grupo que consiste en una malla metálica y una disolución de gel/líquido.

15 Adicionalmente y en otro aspecto, el esqueleto se forma comprimiendo un tubo de malla entre una primera parte de molde de esqueleto y una segunda parte de molde de esqueleto, de tal manera que tras la retirada de la primera y segunda partes de molde de esqueleto, el tubo de malla se asemeja a una forma de válvula de tres valvas.

Finalmente, como puede ser apreciado por un experto en la técnica, la presente invención comprende un método para formar una válvula cardíaca formada según el método descrito anteriormente y en la presente memoria.

Breve descripción de los dibujos

20 Los objetos, características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de las siguientes descripciones detalladas de los diversos aspectos de la invención en conjunto con referencia a los siguientes dibujos, donde:

La Figura 1 es una ilustración de un molde de válvula cardíaca según los principios de la presente invención, que representa una primera parte que está conectada con una segunda parte para formar colectivamente el molde de válvula cardíaca.

25 La Figura 2 es una ilustración de vista isométrica inferior de la primera parte según los principios de la presente invención;

La Figura 2B es una ilustración de vista inferior de la primera parte según los principios de la presente invención;

La Figura 2C es una ilustración de vista lateral izquierda de la primera parte según los principios de la presente invención;

30 La Figura 2D es una ilustración de vista superior de la primera parte según los principios de la presente invención;

La Figura 2E es una ilustración de vista lateral derecha de la primera parte según los principios de la presente invención;

La Figura 3A es una ilustración de vista isométrica inferior de la segunda parte según los principios de la presente invención;

35 La Figura 3B es una ilustración de vista isométrica superior de la segunda parte según los principios de la presente invención;

La Figura 3C es una ilustración de vista inferior de la segunda parte según los principios de la presente invención;

La Figura 3D es una ilustración de vista lateral izquierda de la segunda parte según los principios de la presente invención;

40 La Figura 3E es una ilustración de vista superior de la segunda parte según los principios de la presente invención;

La Figura 3F es una ilustración de vista lateral derecha de la segunda parte según los principios de la presente invención;

La Figura 4A es una ilustración de vista isométrica superior de la primera parte unida con la segunda parte para formar el molde de válvula cardíaca según los principios de la presente invención;

45 La Figura 4B es una ilustración de vista inferior del molde de válvula cardíaca según los principios de la presente invención;

La Figura 4C es una ilustración de vista lateral izquierda del molde de válvula cardíaca según los principios de la

presente invención;

La Figura 4D es una ilustración de vista superior del molde de válvula cardíaca según los principios de la presente invención;

5 La Figura 4E es una ilustración de vista lateral derecha del molde de válvula cardíaca según los principios de la presente invención;

La Figura 5 es una ilustración que representa un esqueleto que se posiciona insertado en el molde de válvula cardíaca según los principios de la presente invención;

10 La Figura 6 es una ilustración que representa un proceso de formación de un esqueleto utilizando un molde de esqueleto con una primera parte de molde de esqueleto y una segunda parte de molde de esqueleto según los principios de la presente invención;

La Figura 7A es una ilustración de vista isométrica superior de la primera parte de molde de esqueleto según los principios de la presente invención;

La Figura 7B es una ilustración de vista superior de la primera parte de molde de esqueleto según los principios de la presente invención;

15 La Figura 7C es una ilustración de vista lateral derecha de la primera parte de molde de esqueleto según los principios de la presente invención;

La Figura 7D es una ilustración de vista inferior de la primera parte de molde de esqueleto según los principios de la presente invención;

20 La Figura 7E es una ilustración de vista lateral izquierda de la primera parte de molde de esqueleto según los principios de la presente invención;

La Figura 8A es una ilustración de vista isométrica inferior de la segunda parte de molde de esqueleto según los principios de la presente invención;

La Figura 8B es una ilustración de vista inferior de la segunda parte de molde de esqueleto según los principios de la presente invención; y

25 La Figura 8C es una ilustración de vista superior de la segunda parte de molde de esqueleto según los principios de la presente invención.

Descripción detallada

30 La presente invención se refiere a un proceso para conformar y fijar células y capas de tejido a medida que se cultivan en tres dimensiones en una válvula cardíaca. La siguiente descripción se presenta para permitir a un experto en la técnica realizar y utilizar la invención e incorporarla en el contexto de aplicaciones particulares. Diversas modificaciones, así como una diversidad de usos en diferentes aplicaciones serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica, donde la invención está definida por las reivindicaciones adjuntas.

35 En la siguiente descripción detallada, se exponen numerosos detalles específicos para proporcionar una comprensión más completa de la presente invención. Sin embargo, será evidente para un experto en la técnica que la presente invención se puede practicar sin estar necesariamente limitada a estos detalles específicos. En otros casos, las estructuras y dispositivos bien conocidos se muestran en forma de diagrama de bloques, en lugar de en detalle, para evitar complicar la presente invención.

40 Obsérvese que, si se utilizan, las etiquetas izquierda, derecha, frente, posterior, superior, inferior, delantero, reverso, sentido horario y sentido antihorario se han utilizado por motivos de conveniencia solamente y no pretenden implicar ninguna dirección fija particular. En su lugar, se utilizan para reflejar las ubicaciones y/o direcciones relativas entre diversas porciones de un objeto.

(1) Descripción

45 La presente invención está dirigida a un método para cultivar válvulas cardíacas de ingeniería de tejidos in vitro. La válvula cardíaca a desarrollar posee una estructura llamada "esqueleto" capaz de soportar materiales de tejidos tridimensionales. Este esqueleto será combinado y sembrado mediante células para producir componentes de la matriz biológica y, finalmente, un tejido naturalmente comparable. Para fabricar estas capas de tejido en tres dimensiones (3D) utilizando un esqueleto, la presente invención incluye un molde de válvula cardíaca para conformar y fijar las células y capas de tejido en forma de una válvula cardíaca.

50 Como se muestra en la Figura 1, el aparato (i.e., molde 100 de válvula cardíaca) incluye al menos dos componentes diferentes que fijan y separan el esqueleto y las células. Específicamente, el molde 100 de válvula cardíaca incluye

una primera parte 102 y una segunda parte 104 que, cuando se combinan, forman colectivamente el molde 100 de válvula cardíaca. El material utilizado para el molde 100 debe ser biocompatible. Esto significa que no debe secretar ningún producto químico perjudicial para las células cuando está en contacto con las células/reactivos. Como un ejemplo no limitativo, la primera parte 102 y la segunda parte 104 se pueden formar de cualquier material sintético o natural, tal como pero sin limitación a Poliéter éter cetona (PEEK).

Como se muestra, la primera parte 102 incluye una protuberancia 106 en forma de válvula cardíaca con una pluralidad de cúspides 108 que se forman para imitar la forma de valva de válvula cardíaca. Debe entenderse que la protuberancia 106 en forma de válvula cardíaca se puede formar en cualquier forma deseada para generar una forma de válvula cardíaca. Como un ejemplo no limitativo, la protuberancia 106 en forma de válvula cardíaca con su pluralidad de cúspides 108 imita la forma de una válvula cardíaca de tres valvas.

La segunda parte 104 incluye un rebaje 110 que se forma para recibir la protuberancia 106 en forma de válvula cardíaca con su pluralidad de cúspides 108. Por tanto y como se muestra, la protuberancia 106 en forma de válvula cardíaca se puede posicionar dentro del rebaje 110 para formar el molde 100 de válvula cardíaca.

Para mejor comprensión, las Figuras 2A a 3F ilustran varias vistas de la primera 102 y segunda 104 partes. Específicamente, las Figuras 2A a 2E proporcionan una ilustración de vista isométrica inferior, una de vista inferior, una de vista lateral izquierda, una de vista superior, y una de vista lateral derecha, respectivamente, de la primera parte 102. Alternativamente, las Figuras 3A a 3F proporcionan una ilustración de vista isométrica inferior, una de vista isométrica superior, una de vista inferior, una de vista lateral izquierda, una de vista superior, y una de vista lateral derecha, respectivamente, de la segunda parte 104. Por tanto, como se puede apreciar, la primera parte 102 se puede conectar con la segunda parte 104 para formar el molde 100 cardíaco, como se representa en las Figuras 4A a 4E. Específicamente, las Figuras 4A a 4E proporcionan una ilustración de vista isométrica superior, una de vista inferior, una de vista lateral izquierda, una de vista superior, y una de vista lateral derecha, respectivamente, de la primera parte 102 unida con la segunda parte 104 para formar el molde 100 de válvula cardíaca.

Como se observó anteriormente, el molde 100 de válvula cardíaca proporciona un entorno conformado en el que un usuario puede cultivar capas de tejido en tres dimensiones (3D) para generar una válvula cardíaca. Al hacerlo y en un aspecto, el molde 100 de válvula cardíaca incluye un orificio de inyección 112 (como se muestra en las Figuras 1, 4A, y 4D) que permite la inserción de células o esqueleto en el molde 100. El orificio de inyección 112 se puede formar a través de la primera 102 o la segunda 104 partes (o entre las partes). De manera importante, el orificio de inyección 112 actúa como un canal hacia un espacio entre la primera 102 y segunda 104 partes cuando están conectadas entre sí. Por tanto, el orificio de inyección 112 permite que un usuario inserte células o material en el molde 100.

Como se muestra en la Figura 5, para ayudar al cultivo de las células, se puede insertar un esqueleto 500 en el molde 100. En otras palabras, el esqueleto 500 se puede posicionar e intercalar entre la primera parte 102 y la segunda parte 104, con las células posteriormente añadidas a través del orificio de inyección 112 en el molde 100.

Debe entenderse que la primera parte 102 y la segunda parte 104 se pueden formar de tal manera que haya un espacio hueco dentro del molde 100 para alojar el esqueleto 500 y cultivo o, en otro aspecto, formar de tal manera que no exista espacio.

Por ejemplo, en un aspecto, no hay espacio hueco formado entre las dos partes cuando no hay esqueleto 500. Sin embargo, un espacio entre las dos partes 102 y 104 es ajustable como se describe a continuación. Por ejemplo, se puede aumentar en base al espesor del tejido objetivo separando las dos partes 102 y 104. En otro aspecto, hay siempre un pequeño espacio entre las dos partes 102 y 104. Este espacio se forma porque los bordes circunferenciales se tocan entre sí antes que las superficies interiores, de modo que habrá una restricción física para que las partes hembra y macho (p.ej., elementos 102 y 104) se toquen completamente entre sí. El tipo de molde 100 se puede seleccionar como se desee en base a la aplicación, tipo de esqueleto, tipo de válvula, etc.

El esqueleto 500 es cualquier material adecuado que pueda operar como una base o estructura sobre la que puedan crecer las capas de tejido. Como un ejemplo no limitativo y como se representa en la Figura 5, el esqueleto puede ser una malla metálica 502 con orificios a través de la misma (como se muestra en el Detalle A). En este ejemplo no limitativo, la malla metálica 502 se conecta con un anillo 504 de base que se asienta alrededor del molde 100 y llena el espacio entre la primera 102 y la segunda 104 partes. Un ejemplo no limitativo específico de tal esqueleto se describe en la Solicitud de Patente de EE.UU. N° 13/427.807, presentada el 22/03/2012, y publicada como el documento US2012-0245706.

Debe comprenderse que aunque se representa un esqueleto 500 de malla, la invención no pretende estar limitada al mismo ya que se puede utilizar cualquier tipo de material de esqueleto biocompatible, incluyendo materiales de esqueleto biológicos y poliméricos, tal como una disolución de gel/líquido. Un ejemplo no limitativo de tal disolución de gel/líquido incluye esqueletos poliméricos sintéticos tales como ácido poliglicólico (PGA), ácido poliláctico (PLA), ácido poli (láctico-co-glicólico) (PGLA)/PGA, ácido PGA/poli L-láctico (PLLA), polietilenglicol (PEG). Ejemplos no limitativos adicionales de esqueletos naturales que se pueden introducir incluyen colágeno, fibrina, ácido hialurónico, y submucosa del intestino delgado (SIS). Debe comprenderse que se puede utilizar cualquier material de esqueleto biocompatible adecuado, incluyendo esqueletos descelularizados y cualquier tipo de materia independientemente de

si es degradable o no.

Como otro ejemplo más, el esqueleto 500 se puede formar de un esqueleto continuo, lo que significa que las valvas, base, y soportes están todos conectados juntos y hechos de un único material. Por ejemplo y como se muestra en la Figura 6, se puede incluir un molde de esqueleto que incluye una primera parte 602 de molde de esqueleto y una segunda parte 604 de molde de esqueleto. La segunda parte 604 de molde de esqueleto se forma en forma de una válvula cardíaca deseada, un ejemplo no limitativo de la cual incluye una válvula cardíaca de tres valvas. Alternativamente, la segunda parte 604 de molde de esqueleto se forma para ser un negativo de la forma de la primera parte 602 de molde de esqueleto. Por tanto, cuando se posiciona un material entre la primera parte 602 de molde de esqueleto y la segunda parte 604 de molde de esqueleto es presionada sobre y en la primera parte 602 de molde de esqueleto, el material es presionado o doblado en la forma de válvula cardíaca deseada, creando así un esqueleto para uso con el molde cardíaco. Como un ejemplo no limitativo y como se muestra en la Figura 6, se puede posicionar un tubo 606 de malla trenzada (p.ej. hecho de Nitinol) sobre la primera parte 602 de molde de esqueleto. La primera parte 602 y segunda 604 partes de molde de esqueleto se diseñan de tal manera que si pones las partes 602 y 604 juntas, habrá un espacio uniforme entre sus superficies de modo que habrá suficiente espacio para que la malla sea colocada en el medio. Dependiendo del espesor de la malla, se puede ajustar la dimensión del espacio.

Por tanto, la segunda parte 604 de molde de esqueleto se puede posicionar sobre el tubo 606 de malla metálica de tal manera que el tubo 606 de malla metálica es presionado entre la primera parte 602 de molde de esqueleto y la segunda parte 604 de molde de esqueleto (i.e., las dos partes 604 y 606 se comprimen juntas). En este aspecto, tras la retirada del molde de esqueleto, el tubo 606 de malla trenzada se presiona en la forma de un esqueleto 608 deseado.

Haciendo referencia de nuevo a la Figura 5, el esqueleto 500 se posiciona en el molde 100 de válvula cardíaca. Las partes de molde (i.e., primera parte 102 y segunda parte 104) se conectan luego entre sí, haciéndolo una estructura cerrada para la inyección de materiales a través del orificio de inyección 112. Después de conectar la primera 102 y segunda 104 partes con el esqueleto 500 sólido en el medio, se pueden inyectar las células (con o sin su matriz biológica) en el molde 100. Como se observó anteriormente, para sembrar las células en/sobre el esqueleto 500 (o en el caso en el que el esqueleto está en forma de líquido/gel), el orificio de inyección 112 permite que las células/esqueleto sean inyectados en el molde 100 de válvula cardíaca. Dependiendo del tipo de esqueleto 500, el molde 100 con sus componentes se debe colocar durante un cierto periodo de tiempo en una incubadora estándar a una temperatura adecuada y con una relación de gas adecuada. Como un ejemplo no limitativo y con fines ilustrativos solamente, por ejemplo, si el esqueleto se hace de colágeno y hay solo un tipo de células tales como células de fibroblastos, este tiempo es aproximadamente de 4 a 10 días para que se forme el tejido. Además, como un ejemplo no limitativo, la incubadora se puede mantener a 37°C con un 5% de CO₂. El esqueleto 500 de líquido/gel/sólido con las células dentro va a ser moldeado por colada (cultivado en 3D) en forma de una válvula cardíaca.

El molde tiene la capacidad de ajustar el espacio entre sus dos componentes diferentes (i.e., primera parte 102 y segunda parte 104) de modo que se pueden añadir múltiples tipos de células y capas de tejido en diferentes pasos. Esto se ha logrado proporcionando una forma ahusada 510 para las cavidades laterales de la parte inferior (i.e., la segunda parte 104). Por lo tanto, la primera capa de tejido se puede formar inyectando las células (con el esqueleto 500 dentro del molde 100 o cuando las células se mezclan con el esqueleto (a través de un esqueleto de líquido/gel) en el molde 100. Como un ejemplo no limitativo, la primera capa incluye células de músculo liso que se inyectan en el molde 100.

El molde 100 se debe colocar en una incubadora como se describe y las células se deben alimentar utilizando un medio apropiado durante un cierto periodo de tiempo hasta que se forme la primera capa de tejido. Como un ejemplo no limitativo, el medio basal para el cultivo células contiene DMEM (p.ej., Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, producido por Invitrogen Corporation, situado en 1600 Faraday Ave., Carlsbad, CA 92006, USA), un 10% de suero bovino fetal (HyClone, Rockford, IL), un 1% de penicilina/estreptomina (Gibco, Carlsbad, CA) y un 1% de L-glutamina (Gibco, Carlsbad, CA) con factores de crecimiento apropiados añadidos al mismo para la mejora del crecimiento y la proliferación.

Luego, después de que se forme la primera capa, en otro paso, el espacio entre la primera 102 y segunda 104 partes del molde 100 se puede ajustar de nuevo para tener suficiente espacio para la adición de la segunda capa. Tal ajuste se puede producir simplemente separando la primera parte 102 un poco de la segunda parte 104, aumentando así el espacio entre la primera 102 y la segunda 104 partes. Posteriormente, se puede inyectar una segunda capa en el molde para encerrar la primera capa y formar un tejido alrededor de ella. Un ejemplo no limitativo de tal segunda capa incluye células de fibroblastos/miofibroblastos.

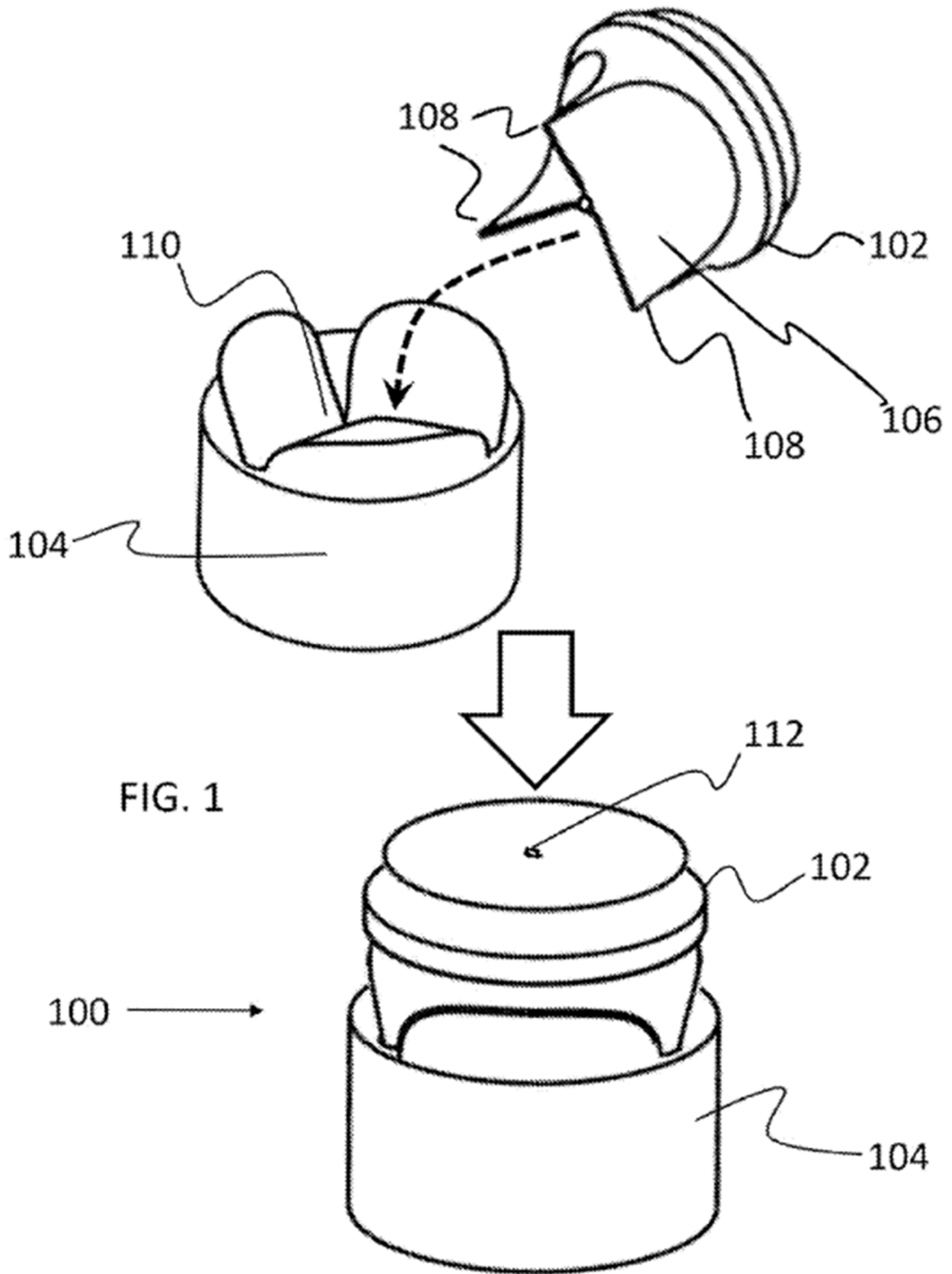
Adicionalmente, se puede también añadir posteriormente una tercera capa (tal como pero sin limitación a, células endoteliales) de manera similar. Esta tercera capa endotelializará la válvula para hacerla similar a un tejido natural y producirá suficientes componentes de matriz extracelular, tal como pero sin limitación a, colágeno, elastina y glicosaminoglicano.

Cuando se han añadido las capas de células deseadas y el periodo predeterminado ha terminado, la válvula cardíaca fabricada se debe retirar del molde 100 cuidadosamente de modo que se puedan añadir a la misma más tarde los medios y suplementos apropiados. Como puede ser apreciado por los expertos en la técnica, los pasos que necesitan

5 ser tomados después son bastante similares a las técnicas de cultivo celular convencionales. Por ejemplo, los pasos incluyen pero no se limitan a, cambiar el medio cada dos a tres días, añadir factores de crecimiento tales como TGF- β 1, acondicionamiento dinámico de la válvula utilizando un biorreactor durante unas horas al día durante 3 a 14 días, utilizar biorreactores de perfusión, y aumentar generalmente la cantidad de proteínas de matriz extracelular mediante una señal mecánica o química. Cuando la válvula está lo suficientemente madura (aproximadamente uno a dos meses) está lista para la implantación in vivo.

REIVINDICACIONES

1. Un método para cultivar una válvula cardíaca in vitro, que comprende las acciones de:
- 5 posicionar un esqueleto entre una primera parte y una segunda parte, teniendo la primera parte una protuberancia en forma de válvula cardíaca con una pluralidad de cúspides que se forman para imitar la forma de una válvula cardíaca y teniendo la segunda parte un hueco que se forma para recibir la protuberancia en forma de válvula cardíaca;
- cerrar la primera y segunda partes alrededor del esqueleto de tal manera que el esqueleto queda encerrado dentro de la primera y segunda partes;
- introducir una primera disolución de células, a través de un orificio de inyección, en el esqueleto;
- incubar la primera disolución de células hasta que se forma una primera capa de tejido;
- 10 ajustar la primera parte con respecto a la segunda parte para crear un espacio alrededor de la primera capa de tejido;
- introducir una segunda disolución de células, a través del orificio de inyección, en el esqueleto para encerrar la primera capa de tejido;
- incubar la segunda disolución de células hasta que se forma una segunda capa de tejido que rodea la primera capa de tejido;
- 15 ajustar la primera parte con respecto a la segunda parte para crear un espacio alrededor de la segunda capa de tejido;
- introducir una tercera disolución de células, a través del orificio de inyección, en el esqueleto para encerrar la segunda capa de tejido; e
- incubar la tercera disolución de células hasta que se forma una tercera capa de tejido que rodea la segunda capa de tejido,
- 20 en donde la primera disolución de células incluye células de músculo liso, la segunda disolución de células incluye células de fibroblastos/miofibroblastos, y la tercera disolución de células incluye células endoteliales.
2. El método según la reivindicación 1, en donde en la incubación de la tercera disolución de células, la tercera capa de tejido endoteliza los tejidos para formar una válvula cardíaca que es similar a un tejido natural.
- 25 3. El método según la reivindicación 2, en donde el esqueleto se selecciona de un grupo que consiste en una malla metálica y una disolución de gel/líquido.
4. El método según la reivindicación 3, en donde la primera y segunda partes se forman de Poliéter éter cetona (PEEK).
5. El método según la reivindicación 4, que comprende además una acción de formar el esqueleto comprimiendo un tubo de malla entre una primera parte de molde de esqueleto y una segunda parte de molde de esqueleto, de tal manera que tras la retirada de la primera y segunda partes de molde de esqueleto, el tubo de malla se asemeja a una
- 30 forma de válvula de tres valvas.



102



FIG. 2A



FIG. 2B



FIG. 2C

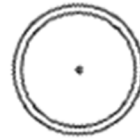


FIG. 2D



FIG. 2E

104



FIG. 3A



FIG. 3B



FIG. 3C



FIG. 3D



FIG. 3E



FIG. 3F

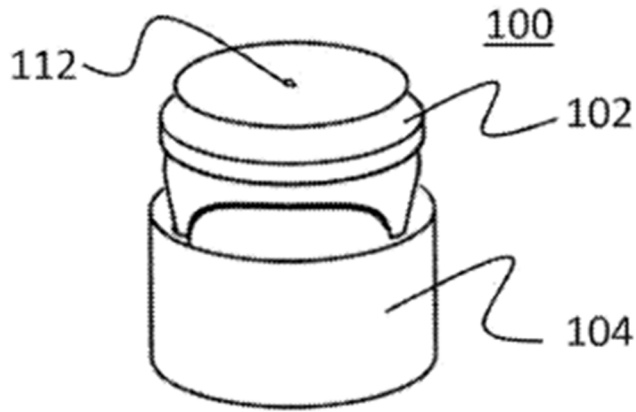


FIG. 4A

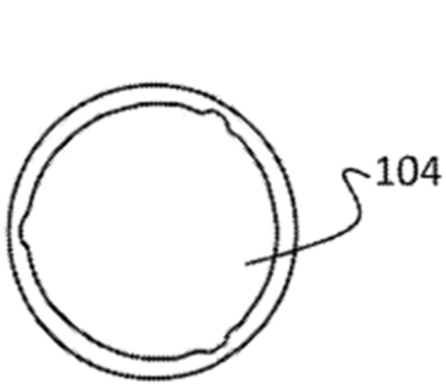


FIG. 4B

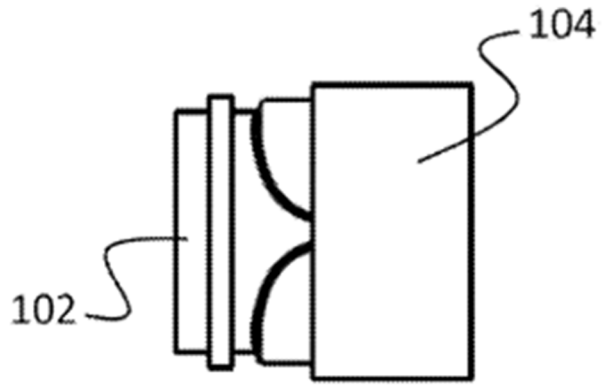


FIG. 4C

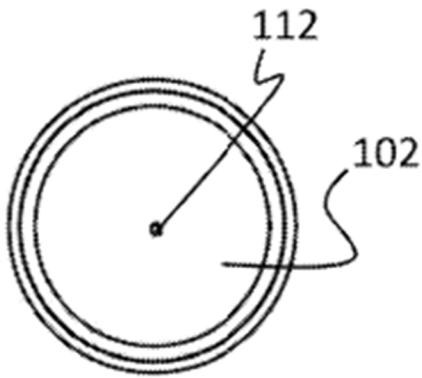


FIG. 4D

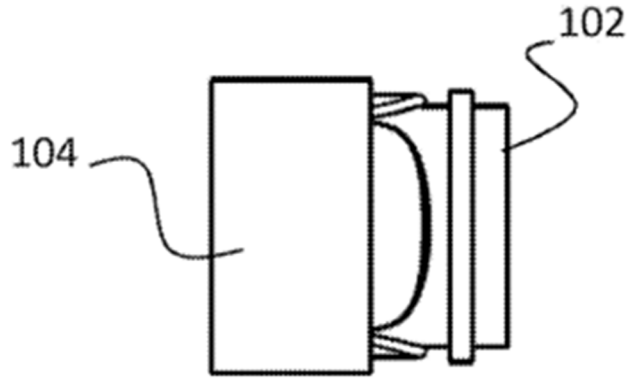


FIG. 4E

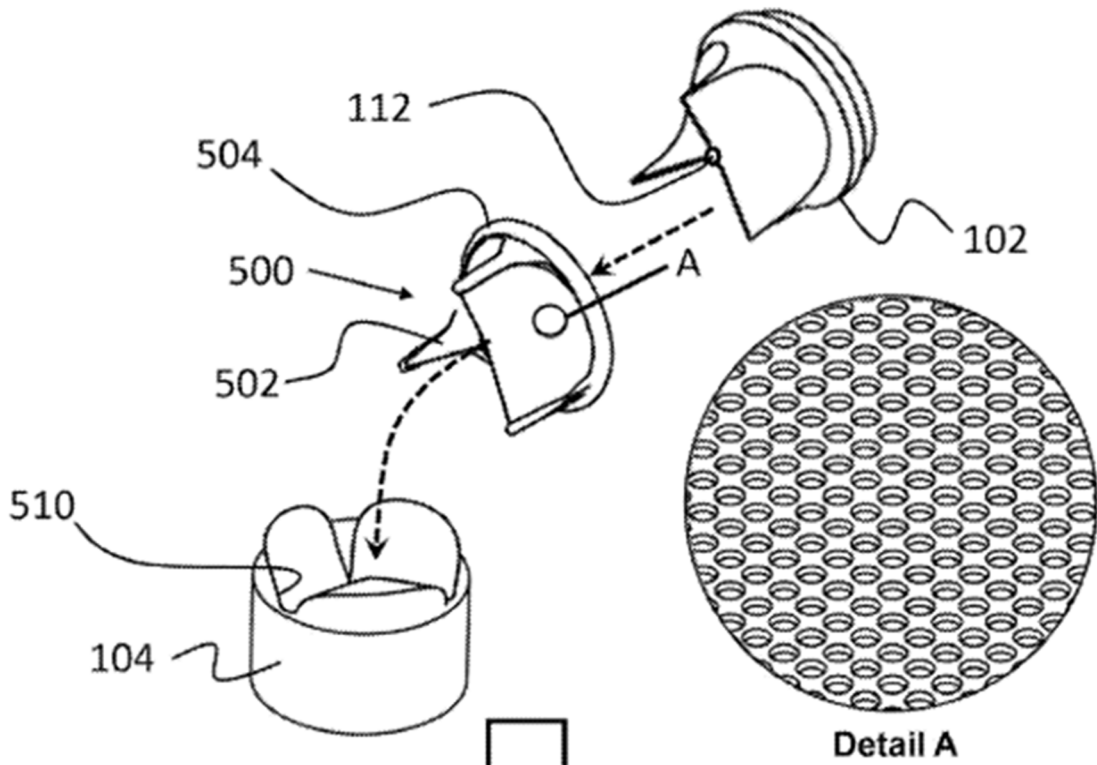
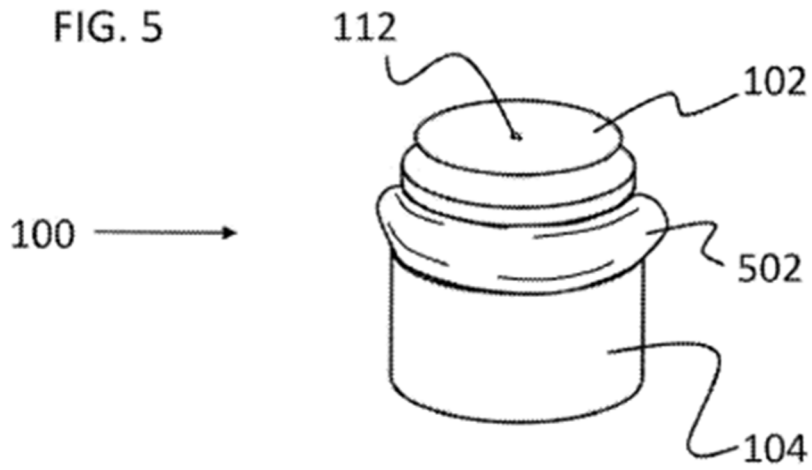


FIG. 5



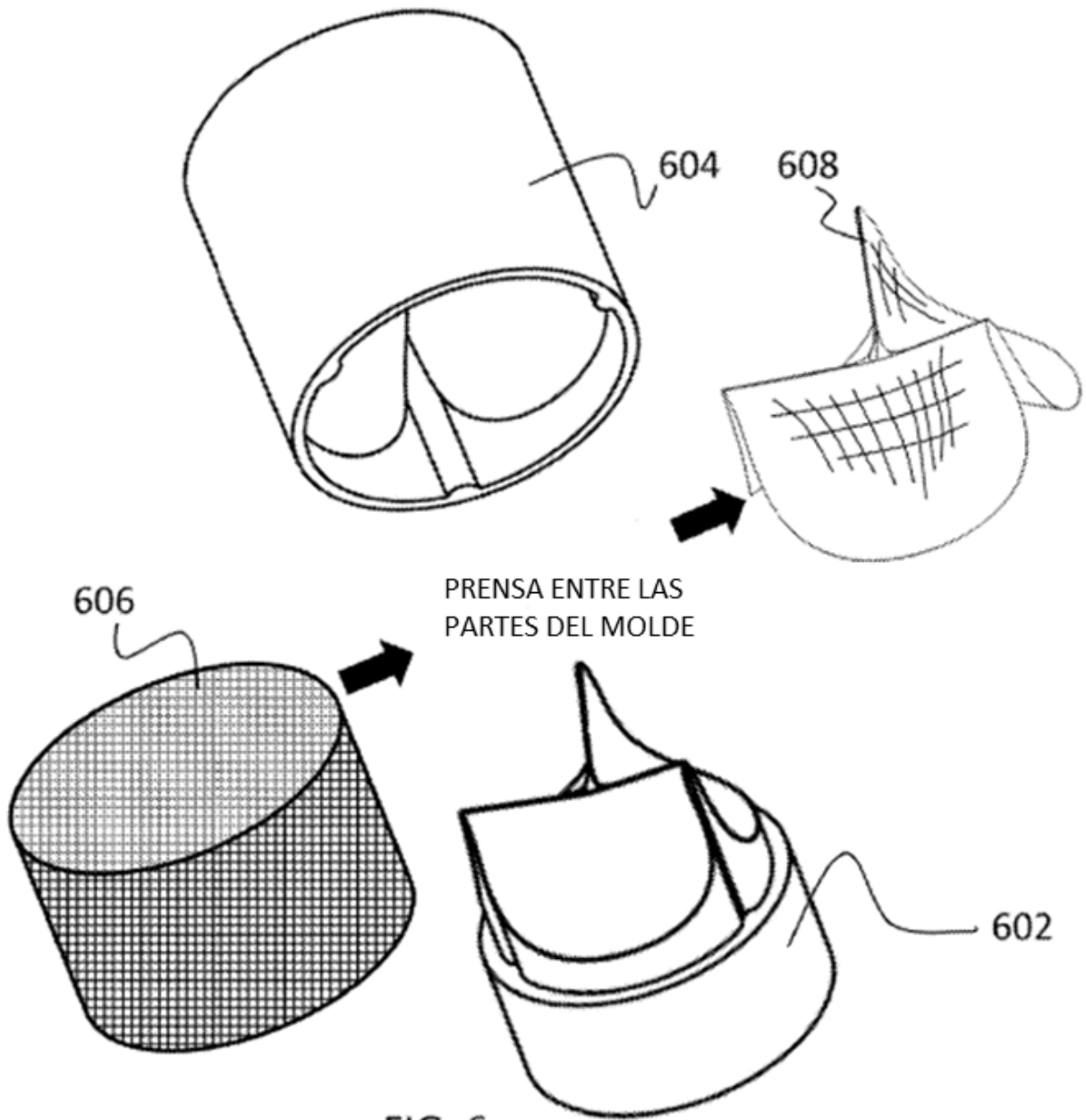


FIG. 6

602



FIG. 7A

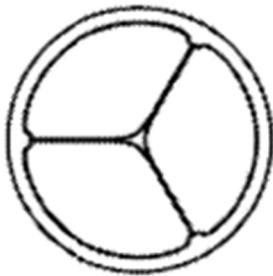


FIG. 7B

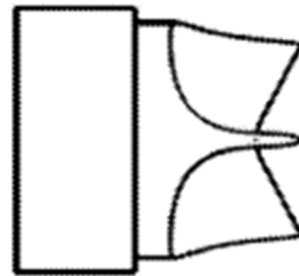


FIG. 7C

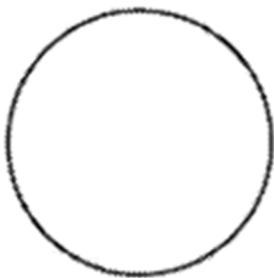


FIG. 7D

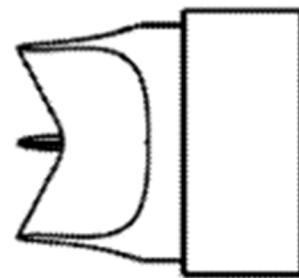


FIG. 7E

604

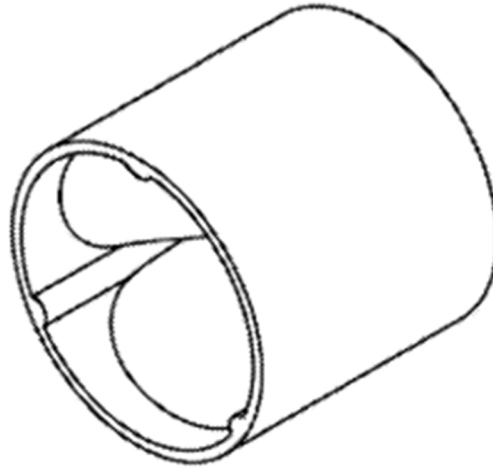


FIG. 8A

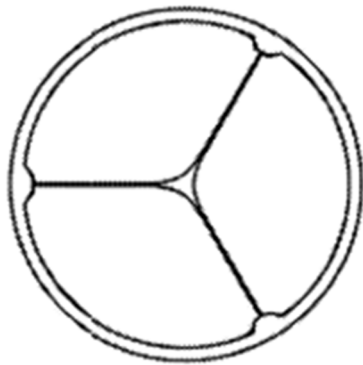


FIG. 8B

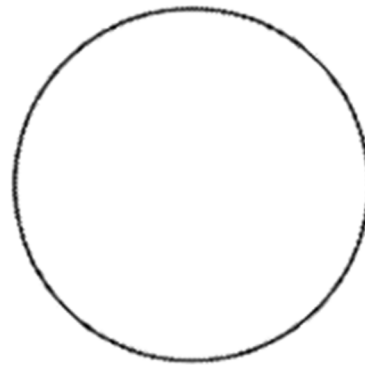


FIG. 8C