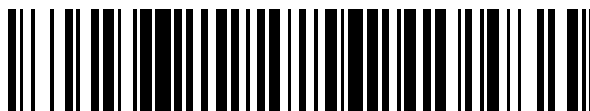


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 721 203**

51 Int. Cl.:

A61L 27/48	(2006.01)
C12N 5/071	(2010.01)
A61L 27/26	(2006.01)
A61L 27/38	(2006.01)
A61L 27/56	(2006.01)
A61L 27/58	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.06.2014 PCT/EP2014/001626**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.12.2014 WO14202199**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2014 E 14731159 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.01.2019 EP 3010556**

54 Título: **Matriz e implante para ingeniería de tejidos**

30 Prioridad:

17.06.2013 EP 13003086

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

29.07.2019

73 Titular/es:

**BAER, HANS U. (100.0%)
Strandweg 3
8807 Freienbach, CH**

72 Inventor/es:

BAER, HANS U.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 721 203 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

Matriz e implante para ingeniería de tejidos

La presente invención se refiere a un implante para ingeniería de tejidos que comprende una matriz sembrada con al menos una célula de islotes de Langerhans según la reivindicación 1 y a un procedimiento de producción de dicho implante según la reivindicación 12.

La ingeniería de tejidos es un campo interdisciplinario que combina la ingeniería y las ciencias de los materiales con la medicina y proporciona un enfoque alternativo en el tratamiento mal funcionamiento o pérdida de órganos. En este enfoque, los andamios temporales (denominados también matrices) sirven como un sustrato adhesivo para las células implantadas y un soporte físico para guiar la formación de los nuevos órganos. Por lo tanto, dichas matrices se utilizan para guiar el proceso de desarrollo tisular mediante el suministro de células a los sitios deseados en el cuerpo, definiendo un potencial espacio para un tejido manipulado por ingeniería, y promoviendo el crecimiento celular. Con el fin de habilitar estos procesos, las matrices para la ingeniería de tejidos deben cumplir los siguientes criterios:

La superficie debe permitir la adhesión celular, promover el crecimiento celular y permitir la retención de funciones celulares diferenciadas. Además, las matrices deben ser biocompatibles y biodegradables de manera que las matrices puedan ser eliminadas eventualmente *in vivo* sin causar inflamación o subproductos de degradación tóxica. Con relación a su estructura, la porosidad de las matrices debe ser lo suficientemente alta como para proporcionar espacio suficiente para la adhesión celular, la regeneración de la matriz extracelular y restricciones de difusión mínimas durante el cultivo. Su estructura de poros debe permitir incluso la distribución celular espacial a lo largo de la matriz para facilitar la formación de tejido homogéneo y el material debe ser procesable, de manera reproducible, en una estructura tridimensional, y debe ser también mecánicamente fuerte.

Se han desarrollado una serie de matrices porosas tridimensionales fabricadas a partir de diversos tipos de materiales biodegradables. El documento EP-A-2256155, por ejemplo, desvela matrices porosas basadas en un polímero o mezcla de polímeros biológicamente compatibles. Según este documento, las matrices porosas se preparan mediante un denominado procedimiento de lixiviación en el que una mezcla compuesta de partículas de polímero y partículas de sal que tienen un tamaño de grano definido se compacta y las partículas de sal se eliminan posteriormente mediante lixiviación.

En la actualidad, se hace uso generalmente de polímeros biodegradables sintéticos ya que pueden ser conformados fácilmente en formas deseadas y tienen mejores resistencias mecánicas que los polímeros derivados de manera natural. Los polímeros biodegradables sintéticos tienen la ventaja adicional de que sus períodos de degradación pueden manipularse también controlando la cristalinidad, el peso molecular y la relación de copolímeros.

Se han investigado también matrices híbridas preparadas a partir de diferentes tipos de polímeros. Por ejemplo, una publicación científica de G. Chen y col.: "A biodegradable hybrid sponge nested with collagen microsponges", *Journal of Biomedical Materials Research*, 2000-08-01, páginas 273-279, desvela una matriz para la ingeniería de tejidos que comprende esponjas híbridas biodegradables de poli(ácido DL-láctico-co-glicólico) (PLGA) poroso con microesponjas de colágeno en los poros de la matriz PLGA. La matriz PLGA porosa se obtiene mediante la dispersión de partículas de cloruro sódico de 355-425 µm en una solución de PLGA en cloroformo, evaporando el disolvente y sometiendo a lixiviación la sal.

Además, una publicación científica de Naoki Kawazoe y col.: "cell leakproof PLGA-collagen hybrid scaffold for cartilage tissue engineering", *Biotechnology Process, American Institute of Chemical Engineers*, vol. 26, N.º 3, 2010-05-01, páginas 819-826, desvela un armazón híbrido de PLGA-colágeno poroso, no permeable a las células, preparado envolviendo las superficies de una esponja de colágeno excepto la superficie superior para la siembra de células con una malla de PLGA de dos capas. A pesar de sus ventajas, las matrices derivadas de polímeros sintéticos adolecen también de diversas limitaciones tales como la falta de señales de reconocimiento de células, aceptación biológica limitada y capacidad funcional. Una limitación adicional es que los polímeros sintéticos son generalmente hidrófobos, tal como lo indican los elevados ángulos de contacto con el agua, lo que se ha encontrado que tiene un impacto fuertemente negativo sobre las actividades de unión celular y de siembra de células en las matrices. Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar una matriz polimérica biocompatible y biodegradable que permita una retención y una proliferación de células eficientes manteniendo al mismo tiempo las propiedades mecánicas deseables de las matrices conocidas, en particular las matrices sintéticas. Según un aspecto más específico, la presente invención tiene como objetivo proporcionar una matriz polimérica que permita su uso en la preparación de un implante, en particular un implante de hígado.

Este objetivo se consigue mediante la matriz porosa según la reivindicación 1, el procedimiento de preparación de la matriz según la reivindicación 12. Otras realizaciones preferentes están sujetas a las reivindicaciones dependientes. La matriz porosa para la ingeniería de tejidos según la presente invención comprende un primer componente polimérico biodegradable y biocompatible que forma una estructura primaria tridimensional con poros primarios y comprende además un segundo componente polimérico biodegradable y biocompatible distinto del primer componente polimérico que se selecciona del grupo que consiste en colágenos, laminina, fibronectina y sus mezclas.

El término "matriz", tal como se usa a lo largo de la presente memoria descriptiva, se refiere a un soporte tridimensional, es decir, una estructura similar a un almacén o una esponja, que es adecuada para ser colonizada por células. En este sentido, la matriz sirve como una plantilla tridimensional que puede ser colonizada por células o tejido. Esta colonización puede tener lugar *in vitro* o *in vivo*. Además, la matriz sirve, en conexión con trasplantes, para la ubicación del trasplante y también como un soporte de sitio para tejido que se forma gradualmente *in vivo*

La expresión "polímeros biocompatibles" se refiere a polímeros que son biológicamente tolerados y que no causan rechazo cuando se introducen en un organismo vivo. Para la presente invención, los polímeros biocompatibles abarcan también polímeros que son reconocidos por un huésped como extraños, pero cuyo rechazo puede ser suprimido mediante una inmunosupresión apropiada.

La expresión "biodegradable" se refiere a un material que puede ser convertido en productos metabolizables en organismos vivos (o fluidos corporales o cultivos celulares derivados de organismos vivos). Los polímeros biológicamente degradables incluyen, por ejemplo, polímeros que son bio-reabsorbibles y/o bio-erosionables. "Bio-erosionable" denota la capacidad de ser soluble o suspendible en líquidos biológicos. Bio-reabsorbible significa la capacidad de poder ser absorbido por células, tejidos o fluidos de un organismo vivo.

De esta manera, el primer componente polimérico puede ser, en principio, cualquier polímero biodegradable y biocompatible que pueda ser usado en el campo de la medicina y, en particular, en medicina de trasplante. Tal como se describirá en detalle a continuación, el primer compuesto polimérico es generalmente un compuesto polimérico sintético. En comparación con los polímeros naturales, los polímeros sintéticos proporcionan generalmente una mayor resistencia mecánica y, por lo tanto, permiten la preparación de una matriz que es adecuada para servir como soporte físico para la unión y la colonización de células.

Ahora, se ha encontrado sorprendentemente que si hay presente un segundo componente polimérico que forma una estructura secundaria tridimensional con poros secundarios, estando contenida la estructura secundaria dentro del espacio interior de al menos una parte de los poros primarios de la estructura primaria, las propiedades hidrófilas de la matriz se mejoran de significativamente, mientras que pueden mantenerse las propiedades beneficiosas, es decir, la resistencia mecánica del primer componente polimérico biodegradable y biocompatible. Gracias a las propiedades hidrófilas mejoradas, la fijación celular y la colonización celular sobre la matriz se facilitan enormemente. A su vez, esto aumenta la probabilidad de un procedimiento de implantación exitoso, es decir, que una matriz implantada sea aceptada por el receptor y no se produzca un rechazo.

Por lo tanto, la presente invención proporciona una solución que permite combinar las propiedades beneficiosas de los polímeros tanto sintéticos como naturales.

En particular, la presente invención permite el uso de un polímero sintético como primer componente polimérico biodegradable y biocompatible que proporciona a la matriz la resistencia mecánica necesaria, mientras que el segundo componente polimérico biodegradable y biocompatible que es un polímero natural seleccionado del grupo de colágeno, laminina y fibronectina proporciona a la matriz propiedades hidrófilas enormemente beneficiosas. La hidrofiliidad de una matriz polimérica para su uso en ingeniería de tejidos se considera muy importante para una siembra celular homogénea y suficiente en tres dimensiones.

Además, tal como se explicará más detalladamente a continuación, la presencia del segundo componente polimérico aumenta altamente el número de posibles opciones de diseño con relación a la estructura de poros de la matriz inventiva. Dependiendo de la disposición específica del segundo componente polimérico dentro de los poros del componente polimérico primario, el tamaño y la forma de los poros primarios pueden adaptarse libremente. Esto permite, por ejemplo, incluir y sembrar más de un tipo de célula dentro de los poros de la matriz mediante la provisión tanto de poros más grandes para alojar células de mayor tamaño de célula como poros más pequeños para retener células de menor tamaño de célula.

La palabra "poros" se usa para designar las cavidades o regiones vacías que están presentes en la matriz según la invención. Pueden tener una forma redonda y/o una forma angular, en particular octagonal, en una sección bidimensional y/o una forma inclinada cuando se observa en 3 dimensiones. Además, la forma se caracteriza preferentemente por extensiones de manera que la forma de las cavidades puede compararse con la forma de las células nerviosas. Como tal, el término "poros" también se refiere a cavidades formadas por filamentos que encierran una región vacía. Estos poros o cavidades también pueden estar interconectados, lo que significa que las paredes de los poros entre dos poros adyacentes pueden comprender orificios, formando una conexión entre dichos poros adyacentes. Aunque tanto los "poros primarios" como los "poros secundarios" se denominan "poros", pueden ser estructuralmente distintos entre sí, por ejemplo con respecto a su forma, tamaño y/o interconectividad.

El tamaño de un poro puede especificarse por medio de su diámetro medio de poro, es decir, la media de los diámetros más largo y más corto de los poros que pueden distinguirse en una sección bidimensional. El tamaño de poro y la distribución de poros pueden determinarse por medio de un microscopio electrónico de barrido (Scanning Electron Microscope, SEM), por ejemplo, de una manera bien conocida por la persona con conocimientos en la materia.

La matriz de la presente invención tiene la ventaja adicional de que no sólo permite adaptar el tamaño de los poros

en la misma, sino que además es posible preparar la matriz con permeabilidades y/o porosidades variables adaptando los gradientes de concentración de poros que tienen un tamaño y/o una forma determinados.

Por ejemplo, los poros pueden estar altamente interconectados o altamente disjuntos. Los poros altamente interconectados generalmente producen una composición con permeabilidad aumentada (tal como una permeabilidad hidráulica o una permeabilidad a una clase determinada de materiales), mientras que los poros altamente disjuntos producen generalmente composiciones con permeabilidad reducida para la misma porosidad, que se calcula dividiendo el volumen de huecos por el volumen total de una muestra representativa de la matriz.

De esta manera, si la matriz debe realizar la función de una matriz permeable o semipermeable con permeabilidad aumentada, la matriz será diseñada con un mayor número de poros interconectados. Por otra parte, una estructura con un mayor número de poros disjuntos puede ser ventajosa para matrices que necesitan tener una estabilidad mecánica particularmente alta.

Según la presente invención, la estructura primaria de la matriz permite la difusión de líquidos y (macro) moléculas en la matriz o incluso su paso a través de la matriz. Para su uso en la ingeniería de tejidos, esta permeabilidad, obedeciendo la ecuación de Fick, es una gran ventaja de la matriz inventiva ya que el intercambio de gases, por ejemplo, oxígeno, líquidos y compuestos, tales como nutrientes celulares y residuos, es esencial para permitir y promover la proliferación celular en y cerca de dichas matrices.

Además, se ha encontrado que la superficie de la estructura primaria de la matriz es capaz de activar factores de crecimiento, tales como factores de crecimiento de vasos (Vessel Growth Factor, VGF), mediante la interacción con el tejido del receptor en el sitio de implantación. Los factores de crecimiento activados son importantes para estimular y atraer las células que conducen a la formación y al crecimiento de pequeños vasos (capilares) en la matriz. Los factores de crecimiento que se activan pueden estar ya presentes en el tejido circundante en el sitio de implantación o pueden proporcionarse también al sitio de implantación con la matriz, por ejemplo, como componente en el material polimérico primario y/o secundario, en el interior de los poros de la estructura primaria y/o secundaria, o mediante el revestimiento de la matriz con un material que comprende los factores de crecimiento.

Por lo tanto, la matriz según la presente invención puede ser ajustada perfectamente a la función específica del órgano a ser reparado o sustituido por la matriz. Además, debido a sus propiedades hidrófilas mejoradas, la matriz de la invención consigue una aceptación altamente mejorada por parte de un receptor y, por lo tanto, es muy adecuada para su uso en la ingeniería de tejidos.

Con relación al material de la matriz, se prefiere además que el primer componente polimérico sea seleccionado del grupo que consiste en poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico-ácido láctico) (PGLA) y sus mezclas. Los componentes poliméricos de ácido láctico (PLA), por ejemplo, ácido poli-L-láctico (PLLA), ácido poli-D,L-láctico (mezcla racémica de L- y D-láctidos; PDLLA), ácido poliglicólico (PGA) o sus mezclas (PLGA; denominado también ahora poli(lactida-co-glicolida) o PLG) son candidatos atractivos para fabricar matrices biodegradables debido a sus propiedades físicas flexibles y bien definidas y su biocompatibilidad relativa. Además, sus productos de degradación son compuestos de bajo peso molecular, tales como ácido láctico y ácido glicólico, que entran en las vías metabólicas normales. Además, los copolímeros de poli(ácido láctico-co-glicólico) ofrecen la ventaja de un amplio espectro de tasas de degradación desde unos pocos días a años, simplemente variando la relación de copolímeros de ácido láctico a ácido glicólico.

En una realización particularmente preferente, el primer polímero es un copolímero de PGA y PLA. Las propiedades de estos polímeros se pueden ajustar cambiando la composición del polímero dentro del tema básico de PLA/PGA.

Más específicamente, el primer componente polimérico es preferentemente poli (ácido glicólico-ácido láctico) que tiene un contenido de ácido láctico de aproximadamente el 85 % en moles y un contenido de ácido glicólico de aproximadamente el 15 % en moles. Dicha mezcla de poli (ácido láctico) (PLLA) y poli (lactida-co-glicolida) (85/15) (PLGA 85/15) puede adquirirse, por ejemplo, en Evonik Industries AG (Essen, Alemania). Otras mezclas de PGA/PLA preferentes son copolímero de D,L-láctido y glicólido 50:50, por ejemplo RESOMER® RG 502; copolímero de D,L-láctido y glicólido 65:35, por ejemplo RESOMER® RG 653; copolímero de D,L-láctido y glicólido 75:25, por ejemplo RESOMER® RG 752; copolímero de D,L-láctido y glicólido 85:15, por ejemplo RESOMER® RG 858.

Tal como se ha mencionado anteriormente, el segundo componente polimérico se selecciona del grupo que consiste en colágenos, laminina, fibronectina y sus mezclas, que son proteínas de la matriz extracelular que pueden prepararse en forma purificada de una manera conocida de por sí o bien pueden obtenerse comercialmente.

De entre estas proteínas de la matriz extracelular, el colágeno es el más preferente. Gracias a su arquitectura nanofibrosa, el colágeno es particularmente eficaz en la promoción de la adhesión celular, el crecimiento y la función diferenciada en los cultivos de tejidos. Sin embargo, se ha encontrado también que, si el segundo componente polimérico comprende colágeno, las propiedades hidrófilas de la matriz según la presente invención se mejoran particularmente. A este respecto, el término "colágeno", como se utiliza en el contexto de la presente invención, abarca colágenos de origen natural y colágenos producidos de forma sintética, y también sustancias derivadas de colágeno, tales como la gelatina, que es una forma hidrolizada de colágeno.

Por lo tanto, la matriz de la presente invención proporciona una estructura híbrida de dos componentes poliméricos biodegradables que es estable, que puede prepararse en diferentes formas y que permite además una buena interacción celular e hidrofiliidad.

5 En base al peso total de la matriz, la relación en peso de estructura primaria a estructura secundaria está comprendida preferentemente en el intervalo de aproximadamente del 1 al 100 %.

Es particularmente preferente además que el segundo componente polimérico consista esencialmente en colágeno. En este sentido, el segundo componente polimérico puede consistir en sólo un tipo de colágeno, es decir, el tipo I, o puede consistir en una mezcla de tipos de colágeno, es decir, una mezcla de colágeno tipo I y colágeno tipo IV. En este último caso, se da preferencia a que la mezcla contenga las proteínas en porcentajes en peso aproximadamente iguales. El colágeno tipo I es uno de los componentes principales de los vasos sanguíneos naturales y proporciona a la estructura secundaria sitios de fijación celular, así como resistencia a la tracción. Tal como se ha indicado anteriormente, el segundo componente polimérico está contenido dentro de los poros primarios de la estructura de poros primarios que proporcionan superficies físicas, sobre las cuales las células pueden colocar, de manera tridimensional, su propia matriz extracelular. Preferentemente, los poros primarios forman una estructura de poros interconectados que comprende una red de canales.

Es particularmente preferente que el segundo componente polimérico sea gelatina. La gelatina es una forma hidrolizada de colágeno, también llamada hidrolizado de colágeno. El contenido de aminoácidos del colágeno hidrolizado es el mismo que el del colágeno. Se usa comúnmente como agente gelificante en la fabricación de alimentos, productos farmacéuticos y cosméticos.

20 En la estructura primaria, los poros primarios tienen preferentemente un diámetro medio de poro de 150 μm a 300 μm , preferentemente de 200 μm a 300 μm . Una estructura porosa con poros (preferentemente interconectados) de este tamaño de poro permite un transporte de nutrientes mejorado al centro de la matriz a través de la estructura primaria y previene también la formación de grandes agrupaciones celulares que pueden desarrollarse potencialmente en centros necróticos debido a la falta de nutrición. Tal como se ha indicado, el tamaño de poro y la distribución de los poros pueden determinarse por medio de un microscopio electrónico de barrido (SEM), que es un procedimiento estándar a este respecto y es bien conocido por la persona con conocimientos en la materia.

30 Con el fin de mejorar aún más la funcionalidad fisiológica de la matriz de la invención, el segundo componente polimérico forma una estructura secundaria tridimensional con poros secundarios. De esta manera, se forma una estructura secundaria porosa tridimensional dentro de la estructura primaria porosa tridimensional, formando básicamente una estructura denominada "andamiaje sobre andamiaje". En este sentido, cabe señalar que el segundo componente polimérico puede formar fibrillas, fibras o espumas como estructura secundaria tridimensional. Sin embargo, el segundo componente polimérico puede estar también en forma de una capa que reviste al menos parte de las paredes internas de los poros primarios, formando de esta manera una estructura secundaria tridimensional basada en la estructura primaria tridimensional subyacente del primer componente polimérico.

35 Las dos estructuras tridimensionales pueden servir a diferentes propósitos. Por ejemplo, la estructura primaria puede proporcionar principalmente estabilidad física a la matriz y puede proporcionar espacio vacío suficiente para alojar células con un tamaño de célula mayor, mientras que la estructura secundaria puede estar diseñada para formar poros más pequeños para retener las células de tamaño de célula menor. Por lo tanto, una matriz según esta realización preferente es particularmente adecuada para incluir y sembrar células de más de un tipo de célula.

40 De esta manera, los poros primario y secundario difieren preferentemente en su diámetro y tamaño medio de poro. En particular, los poros secundarios tienen preferentemente un diámetro medio de poro más pequeño que el diámetro medio de poro de los poros primarios y está comprendido en el intervalo de 50 μm a 290 μm , preferentemente 50 μm a 150 μm , más preferentemente 50 μm a 100 μm .

45 Una matriz que tiene una porosidad alta, en particular con una gran relación superficie/volumen, es altamente preferente ya que permite el suministro de un gran número de células y facilita la invasión del tejido fibrovascular en la matriz después de la implantación.

Además, es altamente preferente que la matriz de la invención esté provista de subestructuras diferentes, es decir, partes, regiones, capas, superficies o sus combinaciones, que tengan permeabilidades diferentes basadas en diferentes tamaños medios de poro en una subestructura respectiva. En particular, la matriz comprende preferentemente al menos dos capas, en las que el diámetro o tamaño medio de poro de los poros en una primera capa es diferente del diámetro o tamaño medio de poro de los poros en una segunda capa.

55 En particular, la matriz comprende preferentemente una capa de base porosa y una capa porosa de inclusión de células, siendo el diámetro o tamaño medio de poro de los poros en la capa base más pequeño que el de los poros en la capa de inclusión de células. En una realización específica, el diámetro o tamaño medio de poro de los poros en la capa de inclusión de células está comprendido en el intervalo de 300 μm a 500 μm , mientras que el diámetro o tamaño medio de poro de los poros en la capa base está comprendido en el intervalo de 10 μm a 200 μm . Gracias a este especial diseño de la matriz, las células de mayor diámetro, es decir, de 200 μm a 300 μm , pueden ser retenidas y colonizadas en la capa de inclusión celular, mientras que las células de menor diámetro, es decir, de 50

5 μm a $200 \mu\text{m}$, pueden ser retenidas y colonizadas en la capa base. En otras palabras, la capa de base actúa como una especie de red de seguridad para retener células de menor diámetro, que de lo contrario podrían "caer a través" de los poros más grandes en la capa de inclusión de células. La capa base proporciona de esta manera una protección eficaz contra el escape de células durante la siembra de células. Al retener más células en la matriz porosa, se facilita en gran medida una regeneración tisular eficaz.

Es preferente además que los poros en la capa base tengan un diámetro o tamaño medio de poro comprendido en el intervalo de $10 \mu\text{m}$ a $100 \mu\text{m}$. Esto permite que también las células pequeñas, tales como hepatocitos que tienen un diámetro celular medio de $20\text{-}30 \mu\text{m}$, puedan ser retenidas y cultivadas efectivamente en la matriz de la presente invención.

10 Cuando la matriz se utiliza para cultivo celular, es importante que proporcione un entorno óptimo que estimule la unión celular, la proliferación y la migración de células a la matriz. Como se mencionó, la presencia de la estructura secundaria proporciona a la matriz propiedades hidrófilas potenciadas, lo que facilita la unión de las células a la estructura de la matriz. Sin embargo, las capacidades para unirse y migrar varían enormemente de un tipo celular a otro.

15 Para facilitar aún más la unión de las células a la superficie de la matriz, la matriz se proporciona preferentemente con un recubrimiento de plasma hidrófilo por tratamiento con plasma antes de que las células se carguen en la matriz. Más preferentemente, la matriz se proporciona con un recubrimiento fino por deposición de plasma de una sustancia polimerizada, preferentemente seleccionada del grupo de (metil)-acrilato (MA), (metil)-acrilato anhídrido (MAA) y poli(2-hidroxietilmetacrilato) (PHEMA).

20 El experto en la materia conoce el tratamiento con plasma. Implica la unión de una monocapa o película de polímero fina a la superficie y se utiliza para mejorar las propiedades de humectabilidad y adhesión de una superficie antes del procesamiento adicional. Más específicamente, generalmente implica las etapas de limpieza de la superficie, activación de la superficie y posterior recubrimiento con plasma de la superficie. Para la limpieza y activación, la superficie normalmente se trata con un gas no polimerizable, tal como argón, oxígeno, nitrógeno o flúor, en un sistema de vacío. Con el fin de obtener una matriz con cualquiera de los diseños descritos anteriormente, la matriz puede prepararse usando tecnología de impresión en 3D y/o plasma y/o electro-hilado.

25 El uso de impresión en 3D para la preparación de la matriz de la presente invención es particularmente preferente debido a que esta tecnología permite fabricar un objeto sólido tridimensional de prácticamente cualquier forma con una precisión impecable. Con relación a la matriz de la presente invención, la impresión en 3D no sólo permite producir la estructura primaria y/o la estructura secundaria, sino que además permite preparar una matriz con células incluidas en la misma, particularmente células de dos tipos diferentes, más particularmente hepatocitos y células de los islotes de Langerhans.

30 El procedimiento de electro-hilado es particularmente adecuado para formar fibras finas que se depositan sobre un objetivo conformando una estructura de malla sobre el mismo. "Objetivo" significa un cuerpo conformado que puede tener diferentes formas, por ejemplo, una forma similar a una placa circular. La matriz según la presente invención comprende fibras de aproximadamente 1 a $100 \mu\text{m}$ de diámetro, preferentemente de aproximadamente 10 a $40 \mu\text{m}$.

Según un aspecto adicional, la presente invención proporciona también un nuevo procedimiento de fabricación que permite una preparación directa y económica de las matrices descritas anteriormente. Dicho procedimiento comprende específicamente las etapas siguientes de:

40 a) proporcionar una mezcla (M) que comprende una solución polimérica (PS-I) de partículas poliméricas del primer componente polimérico disueltas en un disolvente polimérico y partículas de un material lixiviable porógeno, en el que dichas partículas porógenas son insolubles en el polímero disolvente y tienen un tamaño de grano comprendido en el intervalo de aproximadamente $100 \mu\text{m}$ a $400 \mu\text{m}$;

45 b) compactar la mezcla (M) mediante la eliminación del disolvente polimérico (S-I);

c) eliminar el material lixiviable porógeno, produciendo de esta manera la estructura primaria tridimensional con poros primarios;

d) sumergir la estructura primaria en una solución (PS-II) que comprende el segundo componente polimérico disuelto en un disolvente (S-II), y

50 e) eliminar el disolvente (S-II).

La primera etapa a) del procedimiento anterior implica la disolución del componente polimérico primario, por ejemplo PLLA o PLGA, en un disolvente polimérico (S-I), por ejemplo cloroformo o cloruro de metileno. La solución polimérica resultante (PS-I) se mezcla después con un material lixiviable porógeno, por ejemplo un agua, un material lixiviable porógeno soluble en agua, tal como una sal, en particular NaCl, para obtener la mezcla (M). La mezcla también puede efectuarse llenando un recipiente con el material lixiviable porógeno y vertiendo la solución de

polímero (PS-I) en él. Después, se elimina el disolvente polimérico (S-I), por ejemplo por simple evaporación, lo que conduce a una disminución del volumen de la mezcla (M) y, por lo tanto, a una estructura compacta, o por la aplicación de presión sobre la mezcla (M). Después de la eliminación del disolvente polimérico (SI), el material lixiviable porógeno se lixivia, por ejemplo lixiviando la mezcla compactada (M) en agua si se utiliza un material lixiviable porógeno soluble en agua.

La porosidad resultante de la estructura primaria se puede controlar por la cantidad de material lixiviable porógeno añadida, mientras que el tamaño de poro de los poros primarios depende del tamaño de los cristales del material lixiviable porógeno. Con el 70 por ciento en peso de material lixiviable porógeno y superior, se lograron poros primarios con una alta interconectividad.

La compactación se efectúa preferentemente mediante la acción de una presión. Para ello, el polímero/material lixiviable porógeno puede prensarse en una prensa hidráulica convencional a una presión de pistón comprendida en el intervalo de aproximadamente 5,38 mPa a 10 mPa (de 780 psi a 1.450 psi) (en lo siguiente, 1 psi = 0,069 bar), ventajosamente en el intervalo de aproximadamente 5,8 mPa a aproximadamente 8,48 mPa (de aproximadamente 840 psi a aproximadamente 1.230 psi), y en particular en el intervalo de aproximadamente 6,20 mPa a 7,58 mPa (de aproximadamente 900 psi a 1.100 psi). Se ha demostrado que es conveniente permitir que la presión actúe de aproximadamente 10 s a 360 s, ventajosamente de aproximadamente 40 s a 180 s, y en particular de aproximadamente 50 s a 70 s, a temperaturas comprendidas en el intervalo entre 18 °C y 25 °C.

El material lixiviable porógeno se elimina, por ejemplo, disolviéndolo con agua o soluciones acuosas. Primero, la mezcla compactada (material de matriz en bruto) puede empaparse durante aproximadamente 1 h a 80 h, ventajosamente de aproximadamente 12 h a 62 h, y en particular de aproximadamente 36 h a 60 h. De manera alternativa, la mezcla compactada puede lavarse con agua desionizada hasta que el peso de la estructura primaria secada permanezca inalterado.

Además, es ventajoso que la mezcla compactada se almacene inicialmente en una atmósfera de CO₂ antes de que se elimine el material lixiviable porógeno. De esta manera, por ejemplo, la mezcla compactada puede ser gaseada a una presión de CO₂ comprendida en el intervalo de aproximadamente 0,965 MPa (140 psi) a 11,38 MPa (1.650 psi), ventajosamente en el intervalo de aproximadamente 2,48 MPa (360 psi) a 7,722 MPa (1120 psi), y, en particular, en el intervalo de aproximadamente 5,52 MPa (800 psi) a 6,21 MPa (900 psi), con tiempos comprendidos en el intervalo de aproximadamente 1 h a 180 h, ventajosamente en el intervalo de aproximadamente 3 h a 60 h, y, en particular, en el intervalo de aproximadamente 12 h a 36 h, que han demostrado ser convenientes en este sentido. A continuación, la presión se reduce, en el que la velocidad de reducción de la presión tiene una influencia sobre la formación de los poros. Aunque el uso de CO₂ es preferente, otros gases, tales como aire, nitrógeno, helio, neón, criptón, argón, xenón u oxígeno pueden ser también adecuados. Posteriormente, con vistas al secado, el agua o la solución acuosa se eliminan de una manera conocida de por sí. Para conseguir esto, la matriz puede extenderse, por ejemplo, sobre papel absorbente.

Preferentemente, la mezcla (M) de la etapa a) se proporciona añadiendo la solución polimérica (PS-I) a una mezcla de partículas (M_P) compuesta de partículas de polímero del primer componente polimérico y partículas del material lixiviable porógeno. En otras palabras, la mezcla (M) proporcionada en la etapa a) del procedimiento de la invención contiene preferentemente

i) la solución polimérica (PS-I) que comprende partículas del primer componente polimérico disueltas en el disolvente polimérico (S-I) y

ii) una mezcla de partículas (M_P) de partículas de polímero del primer componente polimérico, que tienen preferentemente un tamaño de grano en el intervalo de aproximadamente 100 µm a 300 µm, y partículas del material lixiviable porógeno.

A este respecto, debe señalarse que tanto las partículas de polímero en la mezcla de partículas (M_P) como la solución polimérica (PS-I) son/comprenden partículas de polímero del primer componente polimérico, una vez en el estado disuelto en la solución polimérica y una vez en forma sólida. La cantidad de disolvente polimérico (S-I) en la solución polimérica (PS-I) es preferentemente tal que las partículas de polímero sólidas en la mezcla de partículas (M_P) no se disuelven instantáneamente cuando la solución polimérica (PS-I) se mezcla con la mezcla de partículas (M_P) para la preparación de la mezcla (M). De este modo, la combinación de la solución polimérica (PS-I) y de la mezcla de partículas (M_P) inicialmente da como resultado una pasta agitable que después se solidifica rápidamente a medida que se elimina el disolvente (→ etapa b)).

En una realización preferente, las partículas de polímero del primer componente polimérico usado para preparar la solución polimérica (PS-I) disolviendo las partículas de polímero en un disolvente polimérico (S-I) tienen un tamaño de grano en el intervalo de aproximadamente 100 µm a 300 µm. Las partículas de este tamaño se disuelven rápidamente en una cantidad mínima de disolvente polimérico.

De nuevo, la concentración del primer componente polimérico en la solución polimérica (PS-I) se selecciona convenientemente de manera que el primer componente polimérico esté completamente disuelto, por una parte, y, por otra parte, el disolvente pueda ser eliminado rápidamente sin que las partículas de polímero en la mezcla de

partículas (M_p) empiecen a disolverse en un grado significativo. Una relación en peso de partículas de polímero a polímero disuelto de 10:1 a 1:100, ventajosamente de 2:1 a 1:25, y en particular de 1:1 a 1:10 ha probado ser beneficiosa. En lo que respecta a la relación en peso de las partículas de polímero del primer componente polimérico con respecto a las partículas porógenas en la mezcla de partículas (M_p), es posible, en el contexto de esta
5 realización, seleccionar una relación en peso que sea más alta con respecto al material lixiviable porógeno, es decir, de hasta 1:200, 1:500 o 1:1000, siendo todavía la relación en peso del primer componente polimérico total al material lixiviable porógeno mayor que 1:100. De esta manera, es posible obtener porosidades superiores al 98 %.

La etapa b) del procedimiento anterior concierne a la compactación de la mezcla (M) mediante la eliminación del disolvente polimérico (S-I). Como se mencionó anteriormente, la compactación se efectúa preferentemente por la
10 acción de la presión, por ejemplo, en una prensa hidráulica convencional. Por la acción de la presión, las moléculas de disolvente del disolvente polimérico (S-I) se extraen del espacio intermedio entre las partículas sólidas, en analogía con el agua absorbida en una esponja que se escurre. Sin embargo, el disolvente polimérico (S-I) también se puede eliminar al menos parcialmente, por ejemplo, bajo presión reducida, lo que también conduce a una compactación de la mezcla (M), ya que la eliminación de las moléculas de disolvente del espacio intermedio entre
15 las partículas sólidas permite que las moléculas que permanecen en la mezcla estén más cerca unas de otras. Como resultado, el volumen de la mezcla disminuirá mediante la eliminación del disolvente polimérico (S-I).

El disolvente polimérico (S-I) que se usa para preparar la solución polimérica (PS-) debe disolver al primer componente polimérico pero no al material lixiviable porógeno. Esto garantiza que las propiedades porógenas del material lixiviable no se vean, o solo se vean insignificadamente, afectadas. Para este fin, son adecuados la
20 acetona, acetato de etilo, cloruro de metileno, cloroformo, hexafluoroisopropanol, clorados y fluorados, hidrocarburos alifáticos y aromáticos, tetrahidrofurano, etil metil cetona, dietilcetona, y sus mezclas, por ejemplo, para disolver los polímeros mencionados anteriormente. El cloroformo es, en particular, adecuado para disolver poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico) o poli(ácido glicólico-ácido láctico), y también es adecuado con vistas al uso médico.

En el procedimiento descrito anteriormente, el material lixiviable porógeno sirve como un material que, por definición,
25 se entiende como un material sólido, o al menos semisólido, que inicialmente se une con el polímero formador de matriz para dar una mezcla y que, a continuación, se elimina de la mezcla, resultando en la formación de cavidades (poros).

Para eliminar el material lixiviable porógeno de la mezcla, es conveniente que dicho material sea soluble en al
30 menos un disolvente y que sea esencialmente insoluble en al menos un disolvente adicional. Un material es esencialmente insoluble cuando, en particular, es inferior al 30 % en peso, preferentemente inferior al 20 % en peso, en particular inferior al 10 % en peso, por ejemplo, inferior al 5, 4, 3, 2 y 1 % en peso, soluble bajo las condiciones de procesamiento, es decir, por regla general, a temperaturas comprendidas en el intervalo de 18 °C a 25 °C y bajo presión atmosférica.

La estructura y las propiedades de las estructuras primarias resultantes vienen determinadas esencialmente por la
35 relación de tamaño, forma y peso de las partículas porógenas que se usan para prepararlas. Debido a que el tamaño de las partículas porógenas afectará al tamaño de los poros formados tras lixiviar el material lixiviable porógeno, tiene generalmente un tamaño medio de grano de 100 a 400 μm , preferentemente de 300 a 400 μm . Este tamaño corresponderá aproximadamente al tamaño de los poros formados por la lixiviación de las partículas porógenas.

En este sentido, cabe señalar que no sólo es importante la naturaleza del material lixiviable porógeno, sino también,
40 especialmente, la distribución de los tamaños de grano de las partículas porógenas. De esta manera, se cumple, en general, que no sólo aumenta el tamaño de poro a media que aumenta el tamaño de grano, sino que también aumenta la conectividad, es decir la red de cavidades que se comunican entre sí. Esta red, que se denomina también macroestructura o estructura macroporosa, debe distinguirse de los poros que pueden obtenerse mediante espumación y que, por regla general, están cerrados y por lo tanto forman una estructura que se denomina
45 microestructura o estructura microporosa.

Para el procedimiento de preparación de la invención, el material lixiviable porógeno es preferentemente una sal,
50 más preferentemente seleccionada del grupo que consiste en cloruro sódico, citrato sódico, tartrato sódico y cloruro potásico, más preferentemente cloruro sódico. El cloruro sódico es particularmente beneficioso ya que está ampliamente disponible a un precio bajo, no representa ningún daño al cuerpo humano y, por lo tanto, es fácil de manejar. Además, el cloruro sódico es soluble en una diversidad de disolventes, incluyendo el agua.

Para la preparación de la matriz, la estructura primaria se sumerge a continuación en una solución (PS-II) que
comprende el segundo componente polimérico disuelto en un disolvente (S-II) (etapa d).

Según la presente invención, el segundo componente polimérico se selecciona del grupo que consiste en colágenos,
laminina, fibronectina y sus mezclas. De entre éstos, el colágeno es preferente.

De esta manera, cualquier tipo de disolvente que permita solubilizar el segundo componente polimérico es adecuado
55 para su uso en el procedimiento de la presente invención. Se han encontrado soluciones acuosas ácidas particularmente convenientes para este fin.

En una realización preferente, en la etapa d), la estructura primaria se sumerge en una solución acuosa ácida que comprende el segundo componente polimérico, preferentemente a presión reducida. La inmersión bajo presión reducida permite que los poros primarios de la estructura primaria se llenen completamente con la solución que comprende el segundo componente polimérico.

- 5 En una realización particularmente preferente, la estructura primaria se sumerge en soluciones ácidas de colágeno tipo I (pH 3,2), preferentemente bajo vacío, de manera que los poros de la estructura primaria se llenen con solución de colágeno. La concentración efectiva de colágeno en la solución está comprendida preferentemente en el intervalo del 0,1 al 1,5 % (p/v). Tras la eliminación del disolvente (S-II) en la etapa e), se obtiene la matriz según la presente invención. Preferentemente, los disolventes orgánicos se eliminan a presión reducida. Preferentemente, se realiza
10 una etapa de centrifugación antes de eliminar el disolvente (S-II) a presión reducida.

Los disolventes acuosos se eliminan mediante congelación a -80 °C y liofilización bajo vacío. Unos tiempos de aproximadamente 3 h a 60 h, y, en particular, comprendidos en el intervalo de aproximadamente 12 h a 36 h, bajo vacío, han probado ser convenientes en este sentido.

- 15 En una realización particularmente preferente, el disolvente (S-II) es un disolvente acuoso y la eliminación del disolvente (S-II) en la etapa e) del procedimiento de la invención implica las etapas posteriores de

e1) centrifugación; y

e2) liofilización y/o liofilización al vacío.

- 20 La etapa de centrifugación sirve para eliminar cualquier exceso de la solución que contenga el segundo componente polimérico (PS-II) que no se adhiere a la superficie de la estructura primaria. Mediante secado por liofilización y/o liofilización al vacío, el disolvente (S-II) se elimina esencialmente de forma completa y en la estructura de matriz resultante, el segundo componente polimérico forma una estructura secundaria tridimensional que está contenida dentro del espacio interior de al menos una parte de los poros primarios.

- 25 La cantidad de estructura secundaria contenida dentro de los poros primarios se puede regular ajustando la viscosidad de la solución (PS-II) que comprende el compuesto polimérico secundario disuelto y/o la velocidad de centrifugación. Por ejemplo, cuanto mayor sea la viscosidad de la solución (PS-II) y/o la velocidad de centrifugación, menor será la estructura secundaria que se formará dentro de los poros primarios. En general, para evitar la formación de un exceso de estructura secundaria dentro de los poros primarios, la velocidad centrífuga (o aceleración centrífuga) se establece preferentemente por encima de 500 g. Más preferentemente, la velocidad centrífuga se establece dentro del intervalo de 600 g a 10.000 g. Además, se prefiere que la concentración del
30 segundo componente polimérico disuelto en la solución (PS-II) esté en el intervalo del 0,1 a 1,5 % (p/v). Dentro de este intervalo, la viscosidad de la solución (PS-II) permite una infiltración esencialmente completa de la solución (PS-II) en los poros primarios.

Con el fin de obtener una estructura polimérica secundaria tridimensional altamente reticulada, la matriz puede tratarse además con un agente reticulante, tal como glutaraldehído.

- 35 Además, se prefiere que la matriz se someta a una etapa adicional f) que implica una etapa de modificación de la superficie, en particular una etapa de tratamiento con plasma.

Como se mencionó, la presente invención se refiere a una matriz según la invención para uso terapéutico y, en particular, para su uso en ingeniería de tejidos en general y, más específicamente, para su uso en la preparación de un implante, en particular un implante de hígado.

- 40 En el campo de la ingeniería de tejidos, las matrices según la invención pueden servir como andamiajes a los que las células migran y/o sobre los que se adhieren las células. En la ingeniería de tejidos, esta combinación de matriz y células que se adhieren a esta última generalmente se denomina "implante".

- 45 Las matrices según la invención han demostrado que presentan ventajas cruciales cuando se usan en un implante para la ingeniería de tejidos. Por ejemplo, las dimensiones internas, lo que significa el espacio libre interno, permiten que las matrices sean colonizadas eficientemente con las células. Las matrices son, por una parte, libremente moldeables y, por otra parte, proporcionan una estabilidad y una rigidez adecuadas para soportar el procedimiento de implantación quirúrgica y para resistir las fuerzas mecánicas que actúan en el sitio de implantación. La destrucción de células inicial, que se establece después de la implantación, es limitada y, después de un tiempo corto, el tejido implantado puede asumir la función deseada. Poco después de la implantación, los vasos sanguíneos o los tejidos de granulación ricos en vasos sanguíneos, y también el tejido nervioso, comienzan a proliferar en el
50 implante. Además, las matrices según la invención pueden prepararse sin necesidad de usar disolventes fisiológicamente nocivos, por ejemplo formaldehído, lo que significa que no se requiere un procedimiento especial para eliminar los disolventes y no existe peligro de que queden cantidades residuales de estos disolventes.

- 55 Para esto, las matrices pueden, por ejemplo, inocularse con las células deseadas *in vitro*, tratadas con una solución que contiene células e incubadas hasta que las células se hayan adherido a la matriz. Dicha matriz, junto con las

células que se adhieren a la misma (a la que se hace referencia en la presente memoria como un implante), puede someterse a continuación a etapas de procedimiento adicionales, por ejemplo, cultivo adicional, cuando sea apropiado bajo la influencia de compuestos activos, por ejemplo, con el fin de expandir adicionalmente las células o de modificar sus propiedades, y/o pueden almacenarse hasta su implantación de una manera adecuada, por ejemplo sobre hielo o en un reactor de bio-flujo bajo condiciones estándar. En el contexto de este uso, es ventajoso poder aislar inicialmente y, cuando sea apropiado, también expandir, *in vitro*, las células que están destinadas a la implantación. En particular, esto hace posible aplicar diferentes tipos de células, tales como los hepatocitos reivindicados junto con células de los islotes de Langerhans, a una matriz.

Como se indicó anteriormente, la matriz de la presente invención ha demostrado no solo ser adecuada para el cultivo de células en general, sino en particular para el cultivo de hepatocitos, que se sabe que son muy difíciles de cultivar: aunque el hígado tiene una capacidad asombrosa para la regeneración *in vivo*, los hepatocitos en cultivo tienen una capacidad de proliferación limitada y normalmente no sobreviven durante más de unas pocas horas en suspensión. El problema es que los hepatocitos recién aislados presentan la estructura típica y la mayoría de las funciones de sus homólogos *in vivo*, pero han perdido dominios de membrana especializados, por ejemplo, uniones intercelulares y conductillos biliares, de forma que no pueden sobrevivir sin unirse a un sustrato. Sin embargo, incluso cuando estos hepatocitos se siembran en placas en condiciones de cultivo convencionales, de forma que puedan reagruparse y reconstituir estructuras similares a conductillos biliares, presentan alteraciones fenotípicas tempranas y sobreviven solo unos pocos días.

Surgen aún más dificultades cuando los hepatocitos se van a cargar sobre un sustrato poroso, por ejemplo, para su uso como implante: debido a su pequeño tamaño (de 10 a 15 μm en comparación con, por ejemplo, los fibroblastos de aproximadamente 50 μm), la carga de hepatocitos conlleva el riesgo de que las células caigan a través del sustrato poroso en lugar de quedar retenidas dentro. Este problema se ve agravado por el hecho de que los materiales que se usan generalmente para la fabricación de tales matrices, tal como PLA, PLG, PLGA, etc. son altamente hidrófobos y, de este modo, dificultan cualquier unión celular.

Se ha descubierto, sorprendentemente, que la matriz de la presente invención es particularmente adecuada para el cultivo celular de hepatocitos. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se supone que esto se debe, al menos parcialmente, al hecho de que la matriz de la invención comprende poros primarios que están al menos parcialmente rellenos con la estructura porosa secundaria. Como tal, la matriz también permite la retención de células de tamaño pequeño, tales como los hepatocitos. Al aumentar o disminuir el contenido y/o la porosidad del segundo componente polimérico, el espacio disponible dentro de los poros primarios puede ajustarse a las necesidades para la proliferación celular. En este sentido, es particularmente preferente que el segundo componente polimérico forme una estructura secundaria con una porosidad de al menos el 90 %.

El contenido del segundo componente polimérico se puede ajustar, por ejemplo, ajustando la concentración del segundo componente polimérico disuelto en la solución (PS-II) en que la estructura primaria se sumerge durante la preparación de la matriz descrita anteriormente. Muy preferentemente, la concentración del segundo componente polimérico en la solución (PS-II) está en el intervalo del 0,1 al 1,5 % (p/v).

Además, el componente polimérico secundario que se selecciona del grupo de colágenos, laminina, fibronectina y sus mezclas, proporciona a la matriz excelentes propiedades hidrófilas (es decir, humectabilidad mejorada con agua). El aumento de las propiedades hidrófilas de la matriz de la invención facilita enormemente la siembra de células en la estructura de la matriz porosa, dado que las células pueden infiltrarse más fácilmente en la matriz y adherirse a la estructura secundaria, evitando de este modo la filtración de las células sembradas.

De los materiales mencionados anteriormente que se usan como componente polimérico secundario, el colágeno, en particular la gelatina, es el más preferente. Debido a su arquitectura nanofibrosa, es particularmente eficaz para estimular la adhesión celular, el crecimiento y la función diferenciada en cultivos de tejidos.

Aparte de la composición especial del material proporcionada por el primer componente y por el componente polimérico secundario, se supone que la estructura tridimensional específica de la matriz de la invención proporciona un entorno estructural ideal para la adhesión y el cultivo de células dentro de la matriz. Por ejemplo, el tamaño de los poros, y de los poros primarios en particular, es preferentemente tal que la matriz no solo se puede cargar con células individuales sino también con agrupaciones multicelulares de células, también llamados "esferoides".

La posibilidad de cargar la matriz con agrupaciones multicelulares de células es una ventaja particular cuando se trata de hepatocitos, ya que se ha descubierto que puede disminuirse significativamente su tasa de mortalidad si los hepatocitos se cargan sobre un sustrato en un estado preensamblado. Por lo tanto, teniendo en cuenta el tamaño celular medio de los hepatocitos (10 a 15 μm) y en vista del uso de la matriz para preparar un implante hepático, los poros primarios tienen preferentemente un diámetro de tamaño de poro promedio de 150 μm a 300 μm , preferentemente de 200 μm a 300 μm .

Hace unos años, se ha desarrollado una nueva técnica de cultivo que permite proporcionar tales agrupaciones de células preensambladas en un estado transferible y también conservable. Esta tecnología de cultivo se ha conocido con el nombre de "tecnología de gota colgante", que implica el cultivo de células en gotas de medios de cultivo que

cuelgan en una superficie. Estas gotas de medios de cultivo se inoculan con células vivas y, bajo la fuerza de la gravedad, las células en las gotitas de los medios de cultivo descienden para ensamblarse como un tejido en miniatura, lo que da como resultado microesferoides tisulares multicelulares que son morfológica y funcionalmente muy similares al tejido natural. Estos microtejidos prepreparados se pueden adquirir listos para usar o se pueden producir, por ejemplo, en conformidad con la tecnología GravityPLUS™ desarrollada por InSphero, una empresa procedente del Swiss Federal Institute of Technology (ETH), Zúrich y la Universidad de Zúrich, Suiza. En el presente documento se hace referencia a las divulgaciones de la Patente Europea N.º EP-B1-2342317, relacionadas con la tecnología de gota colgante de InSphero.

En particular, en vista del uso de los microesferoides tisulares multicelulares anteriores, la matriz de la invención es particularmente adecuada dado que los poros de la matriz, que tienen preferentemente poros primarios con un diámetro de tamaño de poro promedio de 150 µm a 300 µm, proporcionan suficiente espacio como para que las agrupaciones de células preensambladas encajen fácilmente en los poros primarios.

Aunque a menudo es preferente la implantación de un implante que se ha cargado con células vivas de antemano (inoculación *in vitro*), otra posibilidad es implantar la matriz (sin ninguna adhesión celular previa) con el objetivo de inducir células precursoras, que tiene la capacidad de regenerar tejidos, de migrar a un tejido dañado y allí regenerar el tejido que se ha perdido. Para esto, la matriz debe configurarse de forma que las células deseadas, pero no las células no deseadas, puedan migrar a la matriz. Tal uso se describe generalmente como una regeneración tisular guiada (RTG).

Por lo tanto, puede usarse una matriz según la invención o un implante según la invención para tratar el cuerpo humano o animal. Para ello, se introducen una o más matrices, o uno o más implantes en el cuerpo a tratar mediante un procedimiento quirúrgico o de intervención. Si el implante contiene células que tienen una función orgánica, o si las células que tienen una función orgánica van a migrar a la matriz, como es el caso, por ejemplo, de las hepatocitos o células de los islotes de Langerhans, las matrices o los implantes pueden implantarse, por ejemplo, en el mesenterio, el tejido subcutáneo, el retroperitoneo, el espacio properitoneal o el espacio intramuscular del individuo a tratar.

En principio, cualquier individuo que requiera una sustitución tisular apropiada puede ser tratado con las matrices o los implantes según la invención. Por regla general, estos individuos son individuos que sufren de una alteración o enfermedad específica cuyo curso implica la pérdida de tejido funcional. Esto puede afectar potencialmente a órganos enteros, por ejemplo al hígado o al páncreas.

Por lo tanto, otro objeto de la presente invención es proporcionar un implante que comprenda una matriz y células incluidas en el mismo para su uso en ingeniería de tejidos.

Este objeto se logra mediante el objeto según la reivindicación 1, que concierne a un implante para ingeniería de tejidos que comprende al menos una matriz de la presente invención y al menos una célula de islote of Langerhans. Las células de los islotes de Langerhans son células del páncreas donde forman agregaciones celulares (los denominados "islotes" de células de Langerhans). Hay aproximadamente un millón de islotes distribuidos por todo el páncreas de un ser humano adulto sano, cada uno de los cuales mide de menos de 40 µm a 400 µm de diámetro y contiene un número de células que oscila de sólo unas pocas células hasta aproximadamente 5.000 células por islote (Bonner-Weir 1994). Del 65 al 80% de las células de los islotes de Langerhans en los seres humanos son células beta productoras de insulina, que están distribuidas a lo largo de todo el islote.

La estructura de la matriz la convierte en un excelente sustrato para las células y es posible cultivar un único tipo celular o diversos tipos de células diferentes en la matriz. A este respecto, además de las células de los islotes de Langerhans, el implante puede comprender otras células, en particular, células hepáticas, pancreáticas, grasas, intestinales, cutáneas, de vasos sanguíneos, nerviosas, musculares, del músculo liso, de la glándula tiroidea, urotelias, de las trompas de Falopio, tejidos urogenitales, fibroblastos o fibrocitos y células de las raíces de los dientes.

Los poros presentes en la matriz proporcionan espacio para el crecimiento celular y la deposición de la matriz extracelular. Debido a que la matriz proporciona la estabilidad mecánica y la elasticidad necesarias, el cultivo celular, después de una fase estática al principio, puede hacerse dinámicamente. Esto significa que, por ejemplo, las células se cultivan en un entorno estático en matraces de cultivo celular o similares. Posteriormente, las células que crecen en el andamiaje se transfieren a una cámara de perfusión que imita un entorno dinámico. Este procedimiento influye sobre el crecimiento celular adicional. Por ejemplo, la composición de la matriz extracelular depende de la tensión mecánica a la que están expuestas las células.

Es particularmente preferente que el implante comprenda adicionalmente hepatocitos, además de las células de islote of Langerhans. En esta realización, el implante comprende por lo tanto dos tipos de células, que son preferentemente células autólogas (células del individuo que recibe el implante posterior), pero, de manera alternativa, pueden ser también heterólogas.

Se ha encontrado sorprendentemente que los implantes según la presente invención que comprenden hepatocitos y células de los islotes de Langerhans proporcionan excelentes sustitutos biológicos del tejido hepático que permiten

restaurar, mantener y mejorar la función orgánica del hígado en caso de enfermedad hepática crónica o aguda. En particular, se ha encontrado que las proporciones específicas de los hepatocitos con respecto a las células de los islotes de Langerhans son particularmente ventajosas para permitir que el implante cumpla su función particular.

5 En una realización particularmente preferente, los implantes se han cargado con microesferoides tisulares multicelulares que comprenden agrupaciones de células preensambladas de hepatocitos y al menos una célula, preferentemente múltiples células, de islote de Langerhans. Tales agrupaciones de células preensambladas, más particularmente agrupaciones de células preensambladas en forma de microesferoides tisulares multicelulares, se preparan preferentemente en conformidad con la tecnología de gota colgante desvelada en el documento EP-B1-2342317, por ejemplo. Como alternativa, las gotas colgantes preparadas fácilmente que contienen las agrupaciones de células preensambladas se pueden adquirir como esferoides prepreparados que se conservan en un estado congelado, preferentemente a -78 °C.

Las agrupaciones de células preensambladas o microesferoides tisulares tienen preferentemente un tamaño de 100 µm a 300 µm de ancho y altura. Como tal, las agrupaciones de células preensambladas encajan fácilmente en los poros primarios cuando la matriz se carga con las células.

15 Por lo tanto, la invención se refiere también, más preferentemente, a implantes que, después de la implantación, realizan las funciones metabólicas de un hígado. Para este fin, la proporción de hepatocitos a células de los islotes de Langerhans es preferentemente de 1×10^6 hepatocitos a 20.000-500.000 células de los islotes de Langerhans, más preferentemente de 1×10^6 hepatocitos a 20.000-100.000 células de los islotes de Langerhans. Más preferentemente, el implante comprende de 1×10^6 hepatocitos a 20.000-70.000 células de los islotes de Langerhans.

En este sentido, debe señalarse que los números anteriores se relacionan explícitamente con el número de células y no con el número de agrupaciones de células preensambladas.

25 Además, la invención se refiere preferentemente a implantes que, después de la implantación, exhiben las propiedades endocrinas de un órgano pancreático equivalente. Para realizar la función del páncreas, el implante comprende preferentemente más células de islotes de Langerhans que hepatocitos. En este sentido, una proporción preferente de hepatocitos con respecto a células de islotes de Langerhans se encuentra en el intervalo de 1:1 a 1:200. Más preferentemente, para este fin, la proporción de hepatocitos con respecto a células de islotes de Langerhans es de aproximadamente 1:100.

30 Las células o las mezclas de células que deben usarse para colonizar matrices según la invención pueden obtenerse de una manera conocida de por sí. Con el fin de producir un implante autólogo, las células se derivan preferentemente del individuo en el que se va a insertar el implante. De esta manera, como regla general, se retira un tejido adecuado, por ejemplo una parte de hígado o de páncreas, del individuo y se prepara de una manera adecuada para la inoculación y el cultivo de la matriz in vitro. En este sentido, es importante que las células exhiban una tasa de vitalidad que sea lo más alta posible.

35 Si se están obteniendo células hepáticas desde el tejido hepático, debe tenerse en cuenta el hecho de que las células hepáticas están rodeadas por una capa gruesa de tejido conectivo, particularmente en el caso de una cirrosis hepática. Según la invención, se usan soluciones de composición definida para poder aislar las células hepáticas que contienen una proporción de células vitales lo más alta posible.

40 Preferentemente, una composición A acuosa que contiene NaCl, KCl, $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, glucosa y ácido etilenglicol tetraacético (EGTA), y tiene un pH de aproximadamente 7,4, se usa para perfundir una parte de hígado o de páncreas. En particular, 1.000 ml de esta solución contienen aproximadamente 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 0,27 g de $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, 1,8 g de glucosa y 1,9 g de EGTA. La perfusión se lleva a cabo preferentemente a una temperatura de aproximadamente 37 °C y a un caudal de aproximadamente 15 ml/min. Unos pocos minutos, en particular de aproximadamente 3 a 5 minutos, por ejemplo aproximadamente 4 minutos, son suficientes para perfundir adecuadamente la parte de tejido al caudal indicado anteriormente.

De manera alternativa, también es posible usar una composición A' acuosa que contiene EGTA para perfundir una parte de hígado o de páncreas.

50 Para perfundir una parte de hígado o de páncreas, se hace uso preferentemente de una composición B acuosa que tiene un pH de aproximadamente 7,3 a 7,4, preferentemente de aproximadamente 7,35. La composición B es preferentemente DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco) con baja glucosa que contiene HEPES, CaCl_2 y colagenasa tipo IV 50 U/ml.

En este caso también, una perfusión a aproximadamente 37°C y un caudal de aproximadamente 10 ml/min ha probado ser conveniente. Unos pocos minutos, en particular de aproximadamente 5 a 10 minutos, por ejemplo de aproximadamente 6 a 7 minutos, son suficientes para perfundir adecuadamente la parte de tejido.

55 De manera alternativa, también es posible usar una composición B' acuosa, que contiene colagenasa e hialuronidasa, para perfundir una parte del hígado o del páncreas. Preferentemente, 1.000 ml de la solución

contienen 50 U de hialuronidasa/ml.

Es ventajoso que la vitalidad de las células sea aislada si la parte de tejido se trata inicialmente con la composición A y a continuación se trata con la composición B. De manera alternativa, es posible usar una composición A' inicialmente y a continuación usar una composición B'.

5 Después de la perfusión, la parte de tejido puede ser cortada y suspendida cuidadosamente en un medio adecuado, por ejemplo, medio E de Williams. Si la suspensión celular resultante todavía contiene restos celulares relativamente gruesos, estos pueden eliminarse de una manera conocida de por sí, por ejemplo filtrando la suspensión celular a través de una red de nylon (100 μm). A continuación, las células del filtrado pueden ser sedimentadas cuidadosamente, en conexión con lo cual se ha demostrado que una centrifugación de tres minutos a 60-130 g y 4-22 °C es ventajosa.

10 Las células que se han aislado se cargan sobre las matrices de una manera conocida de por sí. Como regla general, las células se cargan sobre la matriz como una solución que contiene células y, a continuación, las células y la matriz se incuban, normalmente bajo condiciones de cultivo celular, hasta que las células se adhieran a la matriz. Si se proporcionan células de islotes de Langerhans sobre la matriz con al menos otro tipo de células, por ejemplo, hepatocitos, los diferentes tipos de células pueden cargarse, en principio, de manera conjunta o bien consecutiva, sobre la matriz.

15 Por lo tanto, la presente invención también proporciona un procedimiento de preparación de un implante, que comprende las etapas de

- a. proporcionar una matriz porosa según la presente invención, y
- 20 b. cargar hepatocitos y al menos una célula de islotes de Langerhans en al menos un lado de la matriz.

Más específicamente, preferentemente, las células de los islotes de Langerhans se cargan inicialmente, seguidas por hepatocitos, con una incubación en cada caso que se lleva a cabo después de la carga hasta que al menos una parte de las células se adhiera a la matriz.

25 Muy preferentemente, las células de islotes de Langerhans y los hepatocitos se cargan en la matriz conjuntamente, en agrupaciones de células preensambladas. Dichas agrupaciones de células preensambladas se pueden adquirir o cultivar, por ejemplo, utilizando la tecnología de gota colgante descrita anteriormente.

En una realización particularmente preferente, las agrupaciones de células preensambladas o microtejidos premontados se proporcionan con un tamaño de 100 μm a 300 μm de ancho y altura, de forma que encajan fácilmente en los poros primarios cuando la matriz se carga con las células.

30 La matriz de la presente invención, sin embargo, no solo facilita la deposición de las células sobre la misma, sino que también proporciona un entorno estructural que permite que las células no solo sobrevivan, sino que también proliferen y migren dentro de la matriz. Más específicamente, la matriz de la invención permite el transporte de líquidos y de (macro)moléculas a la matriz o incluso a través de la matriz. Al principio, el intercambio de nutrientes (por ejemplo, oxígeno) y los desechos se realiza por medio de la difusión. Sin embargo, la difusión como medio de transporte pasivo para los procesos biológicos es eficaz solo en distancias cortas. Específicamente, se ha descubierto que la difusión permite el suministro de oxígeno y nutrientes a las células dentro de la matriz, pero solo a una distancia máxima de aproximadamente 400 μm desde la superficie hasta el interior de la matriz. Esto significa que las células que se han depositado en la matriz habitualmente no migran en la matriz a más profundidad que esta distancia de difusión debido a la falta de nutrientes esenciales, especialmente oxígeno. Teniendo en cuenta el intervalo de difusión limitado, la matriz tiene preferentemente un espesor de 0,1 mm a 1,0 mm, más preferentemente de 0,5 mm a 1,0 mm.

45 El implante de la presente invención, es decir, la matriz con células depositadas sobre la misma, por otro lado, no está necesariamente limitado a las dimensiones de la matriz. Si se desea un implante con un espesor de más de 1,0 mm, por ejemplo, por razones de estabilidad o para proporcionar un sitio de unión más grande para las células, el implante puede prepararse a partir de al menos dos matrices que se colocan una encima de la otra y, opcionalmente, se pegan o suturan juntas. Dicho "implante de bi- o multicapa" se prepara preferentemente a partir de al menos dos matrices que se han cargado con células antes del ensamblaje.

En conformidad con una realización particularmente preferida, el implante de la presente invención se prepara como una estructura de bi- o multicapas que forma un cuerpo integrado estable mediante el siguiente procedimiento:

- 50 a) se proporciona una matriz según la presente invención, estando la matriz esencialmente en forma de una lámina con un espesor en el intervalo de aproximadamente 0,1 a 1,0 mm;
- b) se cargan las células - en particular los hepatocitos y al menos una célula de islotes de Langerhans - sobre al menos un lado de la matriz;
- c) la matriz con las células sobre ella se pliega en una estructura de multicapa.

5 Antes de plegar la matriz en la etapa c), la matriz se coloca preferentemente en una incubadora que proporcione condiciones óptimas para la proliferación celular. El espesor preferente de la matriz definida anteriormente garantiza que las células puedan estar suficientemente provistas de oxígeno y nutrientes por difusión, de forma que puedan proliferar y formar tejido funcional, tal como canales de transporte, para permitir también el transporte activo de sustancias a través de la estructura de la matriz. Cuando la matriz se pliega después a una estructura de multicapa (etapa c), el transporte de sustancias también puede tener lugar de forma activa a través del tejido funcional recién formado en toda la matriz. Además, dado que la matriz preferentemente se pliega en lugar de ensamblarse a partir de varias matrices individuales, el implante resultante es particularmente estable y permite un transporte e implantación facilitados, sin riesgo de desensamblado.

10 Muy preferentemente, en la etapa b), las células se cargan sobre ambos lados de la matriz, es decir, en el lado superior e inferior. Esto permite la migración a la matriz desde la parte superior y desde la inferior. La carga de la matriz con células en ambos lados se puede lograr cargando el primer lado de la matriz con células y luego volteando la matriz para cargar el otro lado de la matriz con células. Este procedimiento puede repetirse varias veces, incubando la matriz durante un corto período de tiempo intermedio para permitir a las células migrar a la matriz antes de cargar más células sobre la superficie de la matriz.

15 Es particularmente preferente proveer al implante de multicapa un espesor total en el intervalo de 1 mm a 10 mm. Por ejemplo, una matriz de 0,6 mm de espesor se pliega preferentemente dos veces para obtener un implante de tres capas con un espesor total (o altura) de 1,8 mm.

20 Es posible, adicionalmente, producir un implante de multicapa a partir de más de una matriz. Por ejemplo, una matriz más pequeña se puede colocar en el centro de una segunda matriz más grande y los bordes de la segunda matriz se pliegan posteriormente alrededor de la matriz interior más pequeña. En otras palabras, una primera matriz más pequeña puede estar rodeada por una segunda matriz que se "envuelve alrededor" de la primera matriz. De este modo, la primera matriz se puede inocular con un primer tipo de células y la segunda matriz con un segundo tipo de células antes de plegar la segunda matriz alrededor de la primera matriz.

25 La presente invención está dirigida, en particular, al tratamiento de enfermedades que conducen a enfermedad hepática o pancreática crónica y/o insuficiencia hepática y pancreática crónica. Estas enfermedades incluyen, por ejemplo, hepatitis crónica y cirrosis biliar en adultos, así como atresia biliar y defectos metabólicos congénitos en niños. De hecho, la matriz de la invención puede usarse para aliviar una enfermedad en todos los casos en los que está indicado un trasplante de hígado y en todos los casos de insuficiencia hepática o insuficiencia hepática. Por otro lado, un trasplante de páncreas está indicado, en particular, en el caso de todas las formas de diabetes mellitus, en particular diabetes mellitus tipo I o tipo II. Para tratar una enfermedad pancreática o insuficiencia pancreática, el implante está provisto preferentemente de hepatocitos y células de islotes de Langerhans, muy preferentemente en una proporción de aproximadamente 1 hepatocito a aproximadamente 100 células de islotes de Langerhans.

30 Por lo tanto, la presente invención también se refiere al uso de una matriz según la invención o de un implante según la invención para hacer posible que esté disponible un agente terapéutico para llevar a cabo un trasplante en un individuo y, a este respecto, en particular para tratar a un individuo que padezca una pérdida, al menos parcial, de tejido funcional que será reemplazado por el trasplante.

35 En vista de la matriz y el uso preferente en el campo de la transplantología hepática, la presente invención proporciona adicionalmente un kit para la preparación de un implante hepático. Dicho kit comprende

- 40 i) al menos una matriz de la presente invención y
- ii) microesferoides tisulares multicelulares que comprenden agrupaciones de células preensambladas en medios de cultivo.

45 Según una realización particularmente preferente, el kit comprende al menos una matriz de la presente invención y agrupaciones de células preensambladas de al menos una célula de islotes de Langerhans y hepatocitos en medios de cultivo.

Los microesferoides tisulares multicelulares se preparan preferentemente en conformidad con la "tecnología de gota colgante" descrita anteriormente, por ejemplo, en conformidad con la tecnología de gota colgante GravityPLUS™ patentada por InSphero AG Suiza.

50 Sin limitar la presente invención a las siguientes aplicaciones, se pueden usar matrices según la presente invención, por ejemplo, para el trasplante de fibroblastos, células musculares o células de la mucosa. El trasplante de células de la mucosa es de particular interés en los procedimientos quirúrgicos que implican al intestino delgado.

Materiales y procedimientos

Preparación de la matriz

Se prepararon matrices de 20 mm de diámetro y 2 mm de espesor mediante el procedimiento siguiente:

Ejemplo 1 La estructura primaria tridimensional se preparó a partir de PGLA mediante una técnica de lixiviación de partículas usando partículas de cloruro sódico tamizadas.

5 Se adquirió poli (ácido DL-láctico-co-glicólico) (PLGA 75:25), con un peso molecular de 90-126 kD, de Evonik Industries AG (Essen, Alemania). Los gránulos de PGLA se congelaron en nitrógeno líquido (N₂) y se trituraron a 10.000 rpm durante 2 minutos (sistema de impacto Däschler). El procedimiento de trituración se llevó a cabo en un molino de bolas y se tamizó después de la molienda. Las partículas obtenidas de esta manera tenían un diámetro medio de 108-250 µm.

2 g de los gránulos poliméricos se disolvieron en 50 ml de cloroformo a una temperatura de 22,5 °C durante 80 minutos, dando la solución (A) de polímero.

10 En una etapa siguiente, el NaCl puro se trituró a 10.000 rpm durante 2 minutos. Las partículas obtenidas de esta manera tenían un diámetro medio de 108-390 µm.

0,5 g de los gránulos de polímero triturados y 48 g de las partículas de NaCl trituradas se mezclaron a 90 rpm durante 4 minutos, se guardaron con la solución (A) de polímero y se colocaron en plaquetas cerámicas circulares. El disolvente se vaporizó a 35 °C durante 28 horas. La vaporización del disolvente se llevó a cabo en un horno de temperatura controlada, colocado en una campana de humos para extraer gases tóxicos de cloroformo. El compuesto de sal/polímero restante se presurizó en una prensa de moldeo de alta presión, a 6,89 mPa (1.000 psi) durante 1 min antes de que el NaCl se lixiviara lavando el compuesto con agua desionizada hasta que el peso de la estructura primaria seca permaneciese inalterado. El producto formado de esta manera de una estructura primaria tridimensional con poros primarios se secó a 40 °C durante 12 horas. Un análisis SEM demostró que la estructura primaria tenía una estructura de poros uniformemente distribuida e interconectada. El tamaño y la morfología de los poros eran los mismos que los de las partículas de NaCl usadas. La estructura primaria se sumergió a continuación en solución ácida de colágeno tipo I (1,0 % p/v), pH 3,2, adquirida a ICN Biomedicals, Costa Mesa, California) bajo vacío de manera que los poros primarios se llenaran con solución de colágeno. La estructura primaria que contenía la solución de colágeno se congeló posteriormente a -80 °C durante 12 horas y se liofilizó bajo un vacío de 0,2 torr durante 24 horas adicionales para permitir la formación de una estructura de colágeno secundaria en los poros primarios. La estructura de colágeno se reticuló adicionalmente mediante tratamiento con vapor de glutaraldehído saturado con solución acuosa de glutaraldehído al 25 % a 37°C durante 4 horas. Después de ser reticulada, la matriz se trató con solución acuosa de glicina 0,1 M para bloquear los grupos aldehídos no reaccionados. Después de ser lavada con agua desionizada y liofilizada, se obtuvo, como producto final, la matriz que comprende la estructura primaria con poros primarios y una estructura de colágeno secundaria tridimensional con poros secundarios contenidos dentro de los poros primarios.

Ejemplo 2

Las partículas de NaCl tamizadas (36,0 g) con un diámetro de 355 a 425 µm se colocaron en una bandeja de aluminio y se almacenaron con una solución de PLGA en cloroformo (17,8 ml) a una concentración del 27 % (p/v). Por lo tanto, el PLGA se disolvió en cloroformo y luego se vertió en una bandeja de aluminio llena de las partículas de NaCl como porógeno.

La mezcla se secó al aire en una corriente de aire durante 48 h, seguido de 48 h de secado al vacío. Los bloques de PLGA/NaCl secos se separaron entonces de la bandeja de aluminio y se remojaron en agua desionizada para lixiviar las partículas de NaCl. El lavado se continuó 20 veces, con 500 ml de agua desionizada durante 1 h cada vez, para eliminar completamente las partículas de NaCl. Finalmente, las estructuras primarias de PLGA se formaron después del secado al aire. La porosidad de las esponjas de PLGA se determinó mediante un porosímetro de intrusión de mercurio (AutoPore IV, Shimadzu, Kioto, Japón). Las estructuras primarias de PLGA se cortaron en trozos pequeños de 6,0 mm x 6,0 mm x 5,0 mm para el tratamiento de la superficie.

Se preparó una solución acuosa de colágeno al 0,5 % (p/v) (colágeno de tipo I porcino, aislado por tratamiento enzimático) diluyendo una solución acuosa de colágeno al 1,0 % (p/v) con una solución acuosa de ácido clorhídrico (0,001 M) a una concentración de colágeno del 0,5 % (p/v). El pH de la solución acuosa de colágeno al 0,5 % (p/v) se ajustó a 2,5-3,5.

Las estructuras primarias de PLGA cortadas se sumergieron en la solución acuosa de colágeno al 0,5 % (p/v) a presión reducida, de forma que los poros primarios de las estructuras primarias se llenaran con solución de colágeno. Las estructuras primarias de PLGA conteniendo la solución de colágeno se colocaron sobre membranas de filtro de células que se colocaron en tubos de centrifugación de 50 ml y se centrifugaron durante 10 minutos para eliminar cualquier exceso de solución de colágeno a diversas aceleraciones centrífugas, de 96, 600, 1200, 2400, 5000 y 10,000 g utilizando una centrifuga refrigerada para múltiples usos LX-120 (Tomy Seiko Co., Tokio, Japón) o una centrifuga refrigerada de alta velocidad (Himac CR 21G, Hitachi, Tokio, Japón) a 4 °C. Después de la centrifugación, las estructuras de PLGA tratadas con colágeno se congelaron en un congelador a -80 °C durante 4 h. Los andamiajes porosos congelados se liofilizaron en vacío a menos de 25 Pa durante 24 h. Después de liofilizar, las estructuras de PLGA recubiertas con colágeno se almacenaron en un deshidratador hasta su uso.

Análisis de las propiedades de la matrizCálculo de la porosidad

La porosidad de la matriz se determinó mediante la fórmula siguiente:

$$\varnothing = 1 - (\text{Volúmen Sólido}) / (\text{Volúmen Total})$$

La porosidad de tres matrices de procedimientos de producción por lotes se proporciona en la Tabla 1

5

Tabla 1

lote	Porosidad [%]
Φ_1	97,4
Φ_2	99,5
Φ_3	99,2

Análisis del contenido de colágeno

10

Las estructuras primarias de PLGA se pesaron antes de la inmersión en la solución acuosa de colágeno y los pesos húmedos de las estructuras de PLGA tratadas con colágeno se pesaron después de la centrifugación utilizando una balanza analítica (AG 135, Mettler-Toledo, OH). Las diferencias entre los dos pesos indicaron la cantidad de solución acuosa de colágeno que quedó en las esponjas de PLGA después de la centrifugación.

Análisis de la hidrofiliidad

La hidrofiliidad se ensayó de la manera siguiente: se pipetearon, gota a gota, 300 μ l de solución salina tamponada con fosfato (PBS, Sigma) sobre la matriz para determinar si el líquido es absorbido o repelido por la matriz.

15

Pruebas de adherencia celular

La adherencia celular sobre la matriz se ensayó revistiendo la matriz con colágeno de tipo 1 y pipeteando, gota a gota, 300 μ l de suspensión de células sobre la matriz. A continuación, la matriz cargada con suspensión de células se incubó a 37°C, 5 % de CO₂ y 95 % de humedad relativa. Las células que permanecían en la suspensión y, por lo tanto, no unidas a la matriz se contaron después de uno y tres días mientras se cambiaba el medio.

20

Cálculo del número de células

El número de células se determinó con un hemocitómetro (cámara de Neubauer mejorada) después de teñir la suspensión de células con solución de azul de triptano al 0,2 % durante 2 minutos.

El número de células unidas se determinó según la fórmula siguiente:

$$\frac{[\text{número de células sembradas en la matriz}] - [\text{número de células que permanecen en los pocillos}]}{}$$

= número de células adheridas a la matriz.

25

Aislamiento de célulasAbreviaturas y sustancias:

- EGTA: ácido etilenglicol tetraacético (Sigma E4378)
- Colagenasa tipo I: (Worthington 4196; 246 U/mg)
- FCS: suero fetal de ternera (Sigma F2442)
- 30 - HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfónico (Sigma)
- Medio E de Williams: medio estándar para cultivar hepatocitos que comprende "Medio E de William (Sigma W4128) y 10 % vol. de suero del donante o 10 % vol. de FCS.

35

Se extrajo una parte del hígado, de una manera conocida de por sí, del individuo a ser trasplantado. En primer lugar, la parte de hígado extraída se perfundió durante 7 minutos, a un caudal de 30 ml/min y a 37°C, con una solución (8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 0,266 g de Na₃PO₄ · 12 H₂O, 1,8 g de glucosa y 0,19 g de EGTA; con agua destilada hasta 1.000 ml; pH 7,4). A continuación, la parte de hígado se perfundió durante 10 minutos adicionales, a un caudal de 30 ml/min y a 37°C, con una solución de colagenasa/hialuronidasa (8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 0,266 g de Na₃PO₄ · 1.2

H₂O, 1,8 g de glucosa, 0,735 g de CaCl₂ y 5-10 ml de HEPES; 10 U/ml de colagenasa; con agua destilada hasta 1.000 ml; pH 7,2). Después de finalizar la perfusión, la parte de hígado se cortó y se suspendió cuidadosamente en el medio E de Williams. La suspensión de células se filtró (nailon 100 µm) y a continuación se lavó con medio E de Williams. Después de eso, las células se centrifugaron a 100 g a temperatura ambiente durante 5-10 min. La viabilidad de las células, que se determinó usando Trypan Blue (0,2 %), fue del 70 %.

La viabilidad de la suspensión celular se determinó usando el ensayo de exclusión de colorante azul de tripano y usando la fórmula siguiente:

$$\text{Viabilidad en \%} = \frac{\text{células viables contadas} \times 100}{\text{número total de células}}$$

Las células de los islotes de Langerhans se aislaron a partir de una parte del páncreas de la misma manera.

10 **Colonización de células**

En la primera etapa, las matrices se incubaron con hepatocitos junto con células de los islotes de Langerhans que se aislaron tal como se ha descrito anteriormente en "Aislamiento de células".

Para ello, se prepararon una solución de hepatocitos y una solución de células de los islotes de Langerhans suspendiendo hepatocitos y células de los islotes de Langerhans, respectivamente, en medio E de Williams caliente, completado con suero y la concentración celular de cada solución se ajustó a aproximadamente 1 a 3x10⁶ células/ml. El número de células se determinó mediante recuento en un tubo de conteo de 0,25 mm bajo un microscopio Olympus invertido. 18 ml de solución de hepatocitos y 2 ml de solución de células de islotes pancreáticos de Langerhans se unieron y se re-suspendieron cuidadosamente con el fin de obtener 20 ml de solución celular para el trasplante autólogo. De esta manera, la relación de hepatocitos a células de islotes de Langerhans en la solución mixta de células estaba comprendida en el intervalo de 9:1.

Se prepararon 20 matrices en una placa de múltiples paredes y a continuación se aplicó 1 ml de la solución mixta de células preparada anteriormente (que comprende un número total de 1x10⁶ a 3x10⁶ células) a cada matriz usando una pipeta. Las matrices que habían sido tratadas de esta manera se colocaron a continuación, durante 1 hora, en un incubador de cultivo celular para permitir que las células se adhieran. A continuación, se pipeteó cuidadosamente otro 1 ml de medio E de Williams caliente, completado con suero humano, en cada pocillo de la placa de múltiples paredes como un suministro adicional para las células. Las matrices se incubaron a 37°C, a 5 % de CO₂ y 95 % de humedad relativa durante 24 a 36 horas.

El número de células por matriz se determinó después de la incubación para determinar la tasa de adherencia de las células implantadas sobre la matriz. Las tasas de adherencia se encontraban en el intervalo del 30 % al 66 %

Antes de la implantación, las matrices podrían mantenerse durante aproximadamente 1,5 horas sobre hielo. Si se ha planificado una implantación para un tiempo posterior, la matriz podría almacenarse bajo condiciones estándar en un reactor de bio-flujo durante un máximo de 5 días.

Actividad secretora y tasa de proliferación de los hepatocitos

Se trasplantaron ratas Lewis con matrices colonizadas por células preparadas según el Ejemplo 3 en un procedimiento de implantación ortotópico o heterotópico. Los trasplantes se retiraron una vez más de los animales en diversos tiempos y se examinaron morfológicamente. El número de células en los trasplantes, que exhibieron la forma de un disco circular que tenía un diámetro de 15 mm y un espesor de 2 mm, era de 94x10³, 140x10³ y, respectivamente, 146x10³ a los 1, 6 y 12 meses después del trasplante.

El análisis histoquímico demostró la secreción de albúmina desde las células del implante. Se ha encontrado que la secreción comienza después de dos semanas. Los hepatocitos del trasplante que se retiró un mes después del trasplante exhibieron una expresión normal de albúmina. Se encontraron hepatocitos proliferativos en todas las preparaciones sin que existiera ningún aumento patológico en la tasa de proliferación. Los hepatocitos que habían sido trasplantados según la invención exhibieron una incorporación de BrdU que se incrementó en un factor de 3 en comparación con la de las preparaciones de hígado estándar. Después de la implantación, se investigaron las actividades metabólicas de los hígados.

Vascularización

Una investigación adicional de las matrices preparadas según el Ejemplo 3 mostró que estas matrices estaban extraordinariamente bien vascularizadas sólo un mes después de la implantación. Los vasos sanguíneos extendidos macroscópicamente a la matriz y los hepatocitos trasplantados y las células del islote de Langerhans entraron en contacto como resultado de una capilarización adecuada, con el sistema cardiovascular del receptor del trasplante.

Además, pudo observarse que las células co-trasplantadas del islote de Langerhans no causaron hipoglucemia en el receptor. El rendimiento de la secreción endocrina de estas células, y también de las propias células de los islotes del receptor, fue regulado presumiblemente por un mecanismo de retroalimentación.

Adopción de la función hepática

5 Las ratas Gunn se consideran un modelo animal para el síndrome de Crigler-Najar humano, ya que, como resultado de un defecto enzimático metabólico congénito específico, sus hígados son incapaces de conjugarse adecuadamente la bilirrubina. Como consecuencia, los niveles tóxicos en el plasma sanguíneo de bilirrubina no conjugada conducen a la muerte como resultado de un daño consecuente sustancial.

10 Se trasplantaron tres ratas Gunn con una matriz colonizada por células preparada según el Ejemplo 3. La matriz tenía un área exterior de 10 cm².

15 El nivel de bilirrubina en los animales experimentales cayó sólo cuatro semanas después del trasplante. A partir de ahí, la bilirrubina estaba siendo conjugada. En los tres casos, la bilirrubina conjugada pudo ser detectada, usando una sonda de conducto biliar, en los conductos biliares del hígado que todavía estaban presentes. Por consiguiente, la bilirrubina que se conjugó en la matriz alcanzó el hígado hematogénicamente y podría ser eliminada del hígado a través del sistema de conducto biliar.

REIVINDICACIONES

1. Un implante para ingeniería de tejidos, que comprende
 - al menos una matriz porosa para ingeniería de tejidos, comprendiendo la matriz un primer componente polimérico biodegradable y biocompatible que forma una estructura primaria tridimensional con poros primarios y que comprende adicionalmente un segundo componente polimérico biodegradable y biocompatible distinto del primer componente polimérico seleccionado del grupo que consiste en colágenos, laminina, fibronectina y sus mezclas, en la que el segundo componente polimérico forma una estructura secundaria tridimensional con poros secundarios, estando contenida la estructura secundaria dentro del espacio interior de al menos una parte de los poros primarios; y
 - al menos una célula de islotes de Langerhans, en la que la matriz está esencialmente en forma de una lámina con un espesor en el intervalo de 0,1 a 1,0 mm y está provista de células en al menos un lado, y en la que el implante tiene una estructura de bi- o multicapa proporcionada al plegar la matriz o colocando dos o más matrices una encima de la otra.
2. Implante según la reivindicación 1, en el que el primer componente polimérico de la matriz se selecciona del grupo que consiste en poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico-ácido láctico) y sus mezclas.
3. Implante según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en el que el segundo componente polimérico de la matriz es colágeno, preferentemente gelatina.
4. Implante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que los poros primarios de la matriz tienen un diámetro de tamaño de poro promedio de 150 μm a 300 μm , preferentemente de 200 μm a 300 μm .
5. Implante según la reivindicación 4, en el que los poros secundarios de la matriz tienen un diámetro de tamaño de poro promedio más pequeño que el diámetro de tamaño de poro promedio de los poros primarios y se encuentran en el intervalo de 50 μm a 290 μm , preferentemente 50 μm a 150 μm , más preferentemente de 50 μm a 100 μm .
6. Implante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, comprendiendo la matriz una capa de base porosa y una capa porosa de inclusión de células, siendo el tamaño de poro promedio de los poros en la capa de base más pequeño que el de los poros de la capa porosa de inclusión de células.
7. Implante según una de las reivindicaciones 1 a 6, en el que los poros de la capa de base de la matriz tienen un diámetro de tamaño de poro promedio de 10 μm a 50 μm .
8. Implante según una de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la matriz tiene una porosidad de al menos el 80 %, preferentemente de al menos el 90 %, muy preferentemente de entre el 95 % y el 99,5 %.
9. Implante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende adicionalmente hepatocitos.
10. Implante según la reivindicación 9, en el que la proporción de hepatocitos con respecto a las células de islotes de Langerhans es de 1×10^6 hepatocitos a 20.000-500.000 células de islotes de Langerhans, preferentemente 1×10^6 hepatocitos a 20.000-100.000 células de islotes de Langerhans, muy preferentemente 1×10^6 hepatocitos a 20.000-70.000 células de islotes de Langerhans.
11. Implante según una cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10 para su uso en el tratamiento de una enfermedad hepática crónica o una enfermedad pancreática y/o una insuficiencia hepática crónica y una insuficiencia pancreática.
12. Procedimiento de preparación de un implante según una de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende las etapas de
 - a. proporcionar una matriz porosa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8,
 - b. cargar hepatocitos y al menos una célula de islotes de Langerhans sobre al menos un lado de la matriz, y
 - c. plegar la matriz con las células sobre ella para obtener una estructura de bi- o multicapa.
13. Procedimiento según la reivindicación 12, en el que la etapa b) implica la carga de células sobre ambos lados de la matriz.