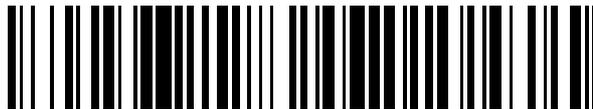


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 766 199**

51 Int. Cl.:

C12M 3/00 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2010 E 18169764 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019 EP 3378930**

54 Título: **Armazón para el crecimiento de tejido in vivo**

30 Prioridad:

16.12.2009 EP 09179465

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

12.06.2020

73 Titular/es:

**VIVABIOCELL SPA (100.0%)
Via del Cottonificio 127
33100 Udine, IT**

72 Inventor/es:

CURCIO, FRANCESCO

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 766 199 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

Almacén para el crecimiento de tejido *in vivo*

La presente invención se refiere a un dispositivo para cultivar células de mamíferos en una estructura tridimensional para el trasplante o implantación *in vivo*. Más particularmente, la presente invención se refiere a un dispositivo de cultivo continuo para el cultivo de células óseas para implantes dentales o reconstrucción ósea.

Existe un creciente interés en la proliferación de células en entornos tridimensionales (3D), tal como en una estructura o almacén 3D. El cultivo celular en almacenes 3D es útil en la ingeniería de tejidos para la generación de estructuras de tejidos implantables. Las dificultades intrínsecas con los cultivos 3D en almacenes 3D son (i) la siembra uniforme y eficaz de las células en los poros del almacén, y (ii) la transferencia de masa limitada a las células en la parte central del almacén.

Las últimas tres décadas han mostrado grandes avances en el área de la ingeniería de tejidos, pero continúa el problema asociado con la dificultad de cultivar células en el centro de estructuras profundas o gruesas.

La Patente de Estados Unidos 6.194.210 describe un procedimiento para el virus de la hepatitis A en un cultivo agregado de células microportadoras.

La Patente de Estados Unidos 6.218.182 describe un procedimiento para cultivar tejidos 3D, en particular tejido hepático para su uso como un dispositivo de asistencia hepática extracorpórea, en un biorreactor en el que las células se siembran y se proporcionan con dos flujos de medios, cada uno en contacto con un lado diferente de las células.

El documento US 2009/0186412 describe un almacén de células poroso y procedimientos para su producción.

Todas las referencias de la técnica anterior abordan los problemas que surgen cuando un sistema de cultivo con una alta densidad de células encuentra irregularidades de flujo.

Los biorreactores conocidos no simulan eficazmente el mecanismo de nutrientes *in vivo* en estructuras gruesas o cuando la densidad de cultivo es alta.

La regulación del flujo, el suministro de nutrientes, los gases y la eliminación de desechos en los cuerpos de los mamíferos es un proceso automatizado que abarca muchas funciones complejas en el cuerpo. La sangre es un sistema complejo, que soporta la capacidad de transportar grandes cantidades de gases y nutrientes hacia y desde las células en todo el cuerpo. El flujo se gestiona por un sistema complejo que altera automáticamente el volumen y la presión para redistribuir el flujo de sangre a áreas de alta demanda. El sistema de distribución incluye miles de ramificaciones y cada ramificación puede tener diámetros internos más pequeños hasta llegar finalmente al nivel dimensional en el que se nutren las células. El uso del programa informático Computational Fluid Dynamics (CFD) permite el análisis del flujo dentro de una estructura compleja y su envase. Cuando se identifica una combinación adecuada de características, se pueden estudiar los parámetros metabólicos para asegurar que tanto la tasa de utilización de los materiales como la producción de productos de desecho permanezcan en una zona generalmente segura. Un ejemplo sería calcular la densidad celular máxima y la tasa de consumo de oxígeno, para asegurar que todas las células permanezcan aeróbicas.

Los inventores han descubierto un dispositivo de cultivo continuo que resuelve el problema del cultivo de células en el centro de estructuras profundas o gruesas.

El objeto de la presente invención es un dispositivo de cultivo continuo que comprende (a) un almacén formado por una matriz de superficies de crecimiento interconectadas espaciadas a intervalos regulares y (b) un medio de distribución de fluidos en la entrada y la salida de las áreas de crecimiento.

El espaciado y la definición se disponen para permitir un flujo direccional a través y alrededor de las superficies de crecimiento de manera uniforme.

El medio de distribución de fluidos en la entrada y la salida de las áreas de crecimiento permite un flujo adecuado a cada superficie de crecimiento. La distribución de fluidos se analiza utilizando la dinámica de fluidos por ordenador y el análisis de utilización de metabolitos clave para asegurar que las células no estén sujetas a condiciones de crecimiento perjudiciales.

Preferentemente, el medio de distribución de fluidos distribuye el flujo entrante de nutrientes y gases nuevos a las superficies de crecimiento. El área de la sección transversal de los canales del dispositivo de distribución y el número de canales se pueden ajustar para facilitar la distribución uniforme a las superficies de crecimiento, dependiendo de la forma de las superficies de crecimiento y del número total de células soportadas por las superficies de crecimiento.

Preferentemente, el dispositivo de cultivo incluye una matriz de superficies de crecimiento interconectadas, definida por la interconexión de múltiples fibras o estructuras tridimensionales, de una manera organizada y repetitiva, que puede incorporar cualquier cantidad de facetas o artefactos de superficie utilizados para promover o potenciar la fijación y el crecimiento de células.

Las estructuras tridimensionales que forman la matriz pueden ser cilíndricas, rectangulares, hexagonales o de cualquier otra forma o combinación de formas, y las superficies pueden ser lisas o texturizadas.

En una realización práctica preferida de la invención, el armazón está formado por una matriz de superficies de crecimiento interconectadas espaciadas a intervalos regulares alrededor de un soporte central.

5 Los espacios abiertos formados por la interconexión de las estructuras, son iguales o mayores que 0,7 mm y menores que 3 mm, preferentemente iguales o mayores que 0,9 mm y menores que 3 mm. El espaciado en la realización preferida es mayor de 1,0 mm, pero puede modificarse según lo requiera la necesidad de resistencia física del armazón. En una realización aún más preferida de la presente invención, las superficies de crecimiento interconectadas están espaciadas a intervalos regulares iguales o mayores que 1,0 mm y menores que 2,0 mm.

10 El espaciado es una característica que caracteriza la presente invención. La variabilidad del parámetro alrededor del intervalo anterior permite optimizar el flujo de medio a través del armazón y, al mismo tiempo, impartir una solidez adecuada a la estructura 3D para todos los dispositivos de acuerdo con la invención independientemente de su forma y dimensión finales. Los espacios abiertos formados por la interconexión de las superficies de crecimiento crean la estructura de caracterización organizada del dispositivo de la presente invención que difiere de la estructura porosa del dispositivo conocida de la técnica anterior.

15 La forma del armazón es preferentemente cúbica, pero podría ser otra forma, por ejemplo, cilíndrica o anatómicamente correcta.

Preferentemente, el dispositivo de cultivo incluye una gran cantidad de superficies de crecimiento interconectadas uniformemente dispuestas para crear grandes áreas abiertas que limitan la cantidad máxima de células por volumen cúbico facilitando la vascularización fácil de las áreas de crecimiento.

20 El dispositivo de cultivo puede estar hecho de cualquier material biocompatible.

Los materiales biocompatibles son cualquier polímero orgánico biocompatible o una mezcla de los mismos, así como combinaciones o mezclas de polímeros orgánicos biocompatibles con compuestos orgánicos o inorgánicos no poliméricos biocompatibles.

25 Ejemplos específicos no limitantes de componentes del material biocompatible útil en la presente invención son policaprolactona, óxido de polietileno - tereftalato, poliamida, poli ácido L-láctico, ácido poliglicólico, colágeno, fibronectina, hidroxiapatita, etc.

30 En una realización práctica preferida, el dispositivo de cultivo comprende además una carcasa sellada asépticamente que puede desmontarse al finalizar el período de cultivo. Dicha carcasa aséptica puede incluir una cubierta extraíble sellada, un medio de distribución de entrada, un medio de distribución de salida opcional y los medios de soporte necesarios para ubicar y asegurar las superficies de crecimiento en el dispositivo de cultivo.

La carcasa puede tener la forma de un rectángulo, cilindro o cualquier otra forma necesaria para sostener el dispositivo de cultivo y proporcionar características adicionales para la extracción aséptica del armazón.

35 La presente invención ofrece varias ventajas sobre los dispositivos de cultivo anteriores en que el suministro de nutrientes permite la creación y el mantenimiento de la viabilidad del tejido en un sustrato grueso (> 1 mm).

El dispositivo de cultivo 3D de la presente invención se puede producir en un procedimiento de una sola etapa.

Como alternativa, primero se puede producir una capa 2D, y después las capas 2D individuales se pueden ensamblar una sobre las otras para formar el dispositivo de cultivo 3D de acuerdo con la presente invención.

La dimensión final del dispositivo de cultivo 3D dependerá del número de capas 2D ensambladas.

40 El dispositivo de cultivo de la presente invención puede usarse eficazmente para cultivar cualquier tipo de células en un tejido 3D. Preferentemente se usa para cultivar células para implantes dentales o reconstrucción ósea. Una vez que las células han proliferado en un tejido 3D, el flujo de medios puede detenerse y el tejido puede usarse o conservarse para su uso futuro.

45 El dispositivo de cultivo de la presente invención también puede usarse eficazmente para cultivar células directamente en el cuerpo. De hecho, el dispositivo puede implantarse en el paciente que necesita reconstrucción de tejido y el cultivo se realiza *in vivo*.

Mediante el uso del dispositivo de cultivo de acuerdo con la presente invención, las células pueden proliferar en un entorno controlado sobre un armazón biodegradable. Las grandes áreas abiertas formadas por la interconexión de las superficies de crecimiento les permite exponerse a un flujo uniforme de medio y evitar deposiciones de suciedad durante el proceso de crecimiento. En particular, se evita la deposición de suciedad o el bloqueo de la superficie de crecimiento por burbujas de gas durante el proceso de crecimiento.

Además, con el dispositivo de cultivo de la invención, las condiciones de cultivo se controlan continuamente y cualquier desviación de las condiciones deseadas se corrigen y avisan de forma automática. Esto proporciona las condiciones necesarias para mantener las células en su estado indiferenciado, para minimizar la densidad celular máxima y la necrosis tóxica asociada, y para proporcionar un entorno que no esté limitado a la difusión de nutrientes y gases clave.

- 5 Además, el dispositivo de cultivo según la presente invención también proporciona el crecimiento de tejidos en ausencia de células, como se muestra en experimentos llevados a cabo en conejos.

Ejemplo

Protocolo experimental

- 10 Se usó un armazón de dos capas (11 mm x 11 mm x 5 mm) de acuerdo con la presente invención, cortado en cuatro piezas de igual dimensión, para el experimento de crecimiento celular en ratones.

Análisis histológico y resultados

Los cuatro dispositivos de cultivo continuo se implantaron en ratones NOD/SCID inmunodeficientes.

El análisis de la reacción inflamatoria después de una semana desde la implantación no mostró signos de reacción inflamatoria típica, es decir, enrojecimiento, exudados, etc.

- 15 El análisis histológico del material de control HA (Hidroxi Apatita), es decir, un material biomédico disponible comercialmente utilizado como muestra patrón, no reveló flogosis (por ejemplo, infiltración linfocítica), por el contrario, reveló la integración del material cerámico poroso con los tejidos (colonización por fibroblastos de los poros del material).

- 20 Se eliminó la policaprolactona de todas las muestras que contenían el dispositivo de cultivo continuo objeto de la presente invención y se reemplazó por parafina. Esto dio como resultado una imagen negativa o vacía en las microfotografías.

- 25 El análisis histológico de las muestras P (Policaprolactona), PC (Policaprolactona con células), PD (Policaprolactona con inmersión con fosfato tricálcico) (Figura 7) y PDC (Policaprolactona con inmersión con fosfato tricálcico con células) (Figura 8) no reveló ningún proceso inflamatorio de tejido. Después, la implantación *in vivo* del dispositivo de cultivo continuo objeto de la presente invención, proporcionó crecimiento celular sin implicar proceso de inflamación de tejido.

El análisis realizado en ratones demostró que el dispositivo de cultivo continuo es biocompatible y no tóxico localmente. Además, la estructura 3D característica del dispositivo de cultivo continuo proporciona la regeneración del tejido.

- 30 La presente invención se ilustra, a continuación, con más detalles en los siguientes dibujos que representan realizaciones específicas de la invención sin limitarla.

Breve descripción de los dibujos

Fig. 1 Una realización del armazón

Fig. 2 Una realización de un dispositivo de distribución de flujo

Fig. 3 Una realización de armazón entre dos dispositivos de distribución de flujo

Fig. 4 Diagrama de flujo del sistema

Fig. 5 Análisis de flujo con CFD

Fig. 6 Análisis de flujo fotográfico

Fig. 7 Microfotografía de la muestra PD

Fig. 8 Microfotografía de la muestra PDC

Fig. 9 Fotografías de las muestras HA, PD y PDC

Descripción detallada de los dibujos

La Fig. 1 es una realización del armazón. El armazón (1) está formado por la interconexión de una matriz de estructuras cilíndricas (3). El armazón (1) se forma alrededor del soporte central (2).

- 35 La Fig. 2 es una realización del dispositivo de distribución de fluidos (5). En este dispositivo, el fluido se presenta al dispositivo (5) en un conducto común (6) que está conectado a los conductos de distribución (7). Se muestra un medio de soporte (8) para conectarse con el soporte central (2) del armazón (1).

5 La Fig. 3 representa un almacón (1) colocado entre dos de los dispositivos de distribución (5). En esta realización, el fluido se suministra al conducto común de entrada (6) y se distribuye adicionalmente a los conductos de distribución (7) y después se distribuye a través y alrededor de las estructuras abiertas (4) del almacón (1). El fluido se recoge y se presenta a los conductos comunes (7), ubicados en el dispositivo de salida (5B) en el que se recoge y se presenta al conducto común (6) del dispositivo de distribución (5B).

10 La Fig. 4 es una vista esquemática del dispositivo de cultivo (10) conectado a un sistema de circulación central (9). Cuando el dispositivo de cultivo (10) está conectado al sistema (9), este está colocado para recibir un flujo continuo de nutrientes y gases disueltos proporcionados por la bomba (12). Se crea un bucle de circulación central conectando la salida de la bomba (12) con la entrada del dispositivo de cultivo (10). La salida del dispositivo de cultivo (10) está conectada con la entrada de la bomba (12) a través del depósito de fluido (13). Hay una variedad de sensores (11) en comunicación constante con el fluido en el sistema (12). Los sensores (11) están conectados con un medio de control (20) que monitoriza y controla las condiciones del sistema (12). Se proporcionan bombas adicionales (14, 15) para proporcionar el suministro medido de nutrientes nuevos al sistema y materiales de desecho del sistema.

15 La Fig. 5 ilustra un ejemplo de análisis con Computational Fluid Dynamics, en el que la distribución del flujo es a través de la estructura.

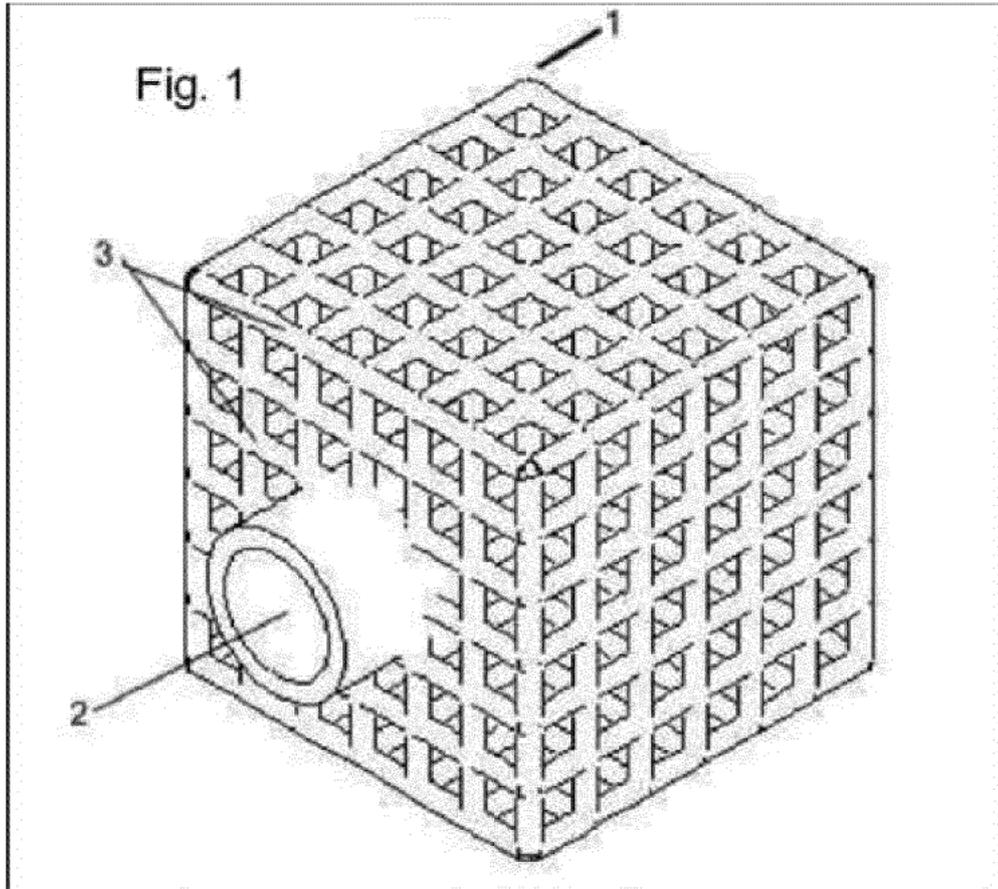
La Fig. 6 es un análisis de flujo fotográfico.

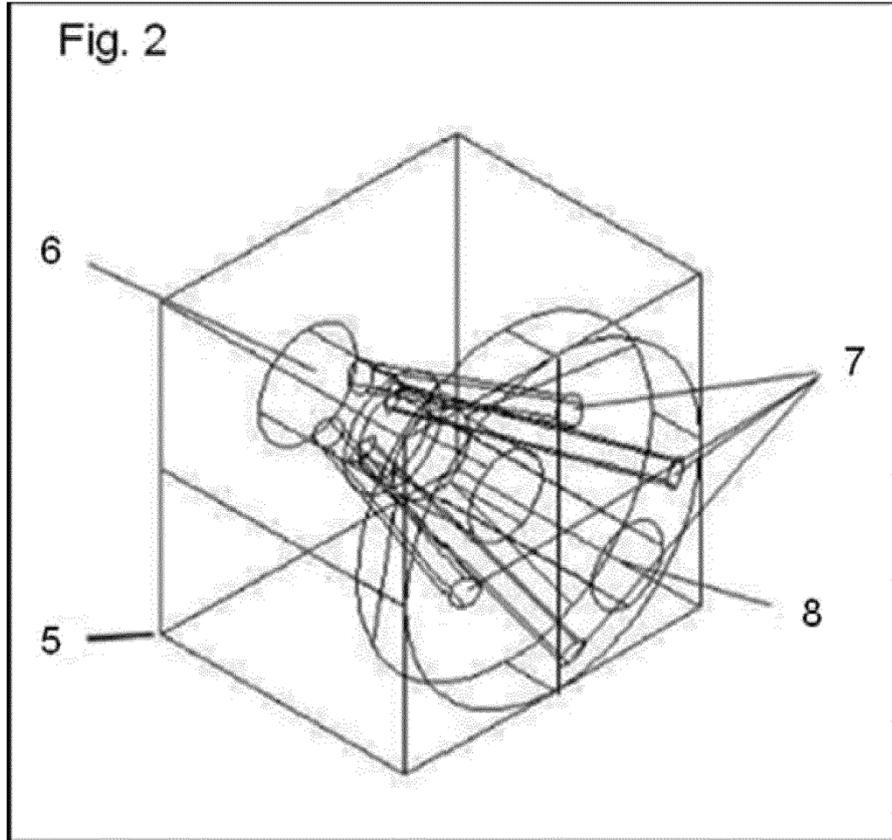
La Fig. 7 y la Fig. 8 ilustran el crecimiento de las células y la ausencia de proceso inflamatorio para la muestra PD y para la muestra PDC respectivamente. Las microfotografías tienen un aumento de 20X y las epidermis están en la parte superior de las microfotografías.

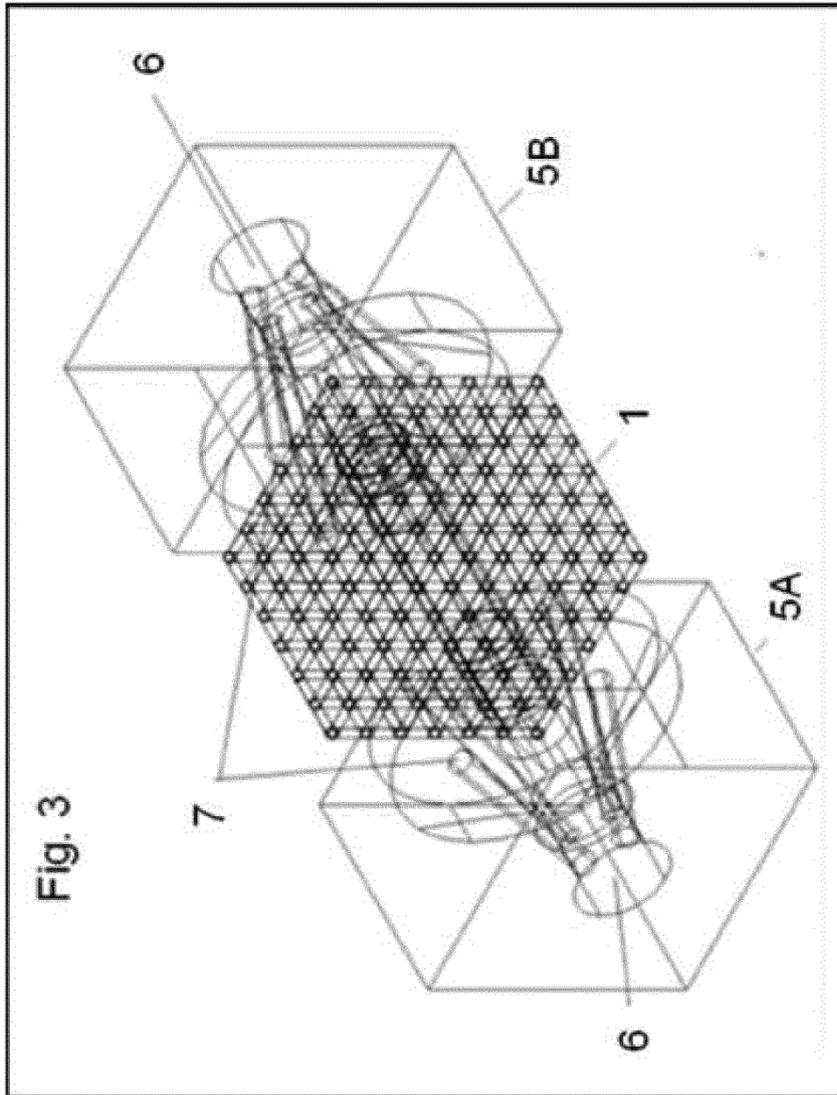
20 La Fig. 9 ilustra las áreas de aplicación y análisis de las muestras HA, PD y PDC para los experimentos de crecimiento celular en ratones. El análisis externo de las muestras no revela ninguna reacción fibrótica o proceso de inflamación.

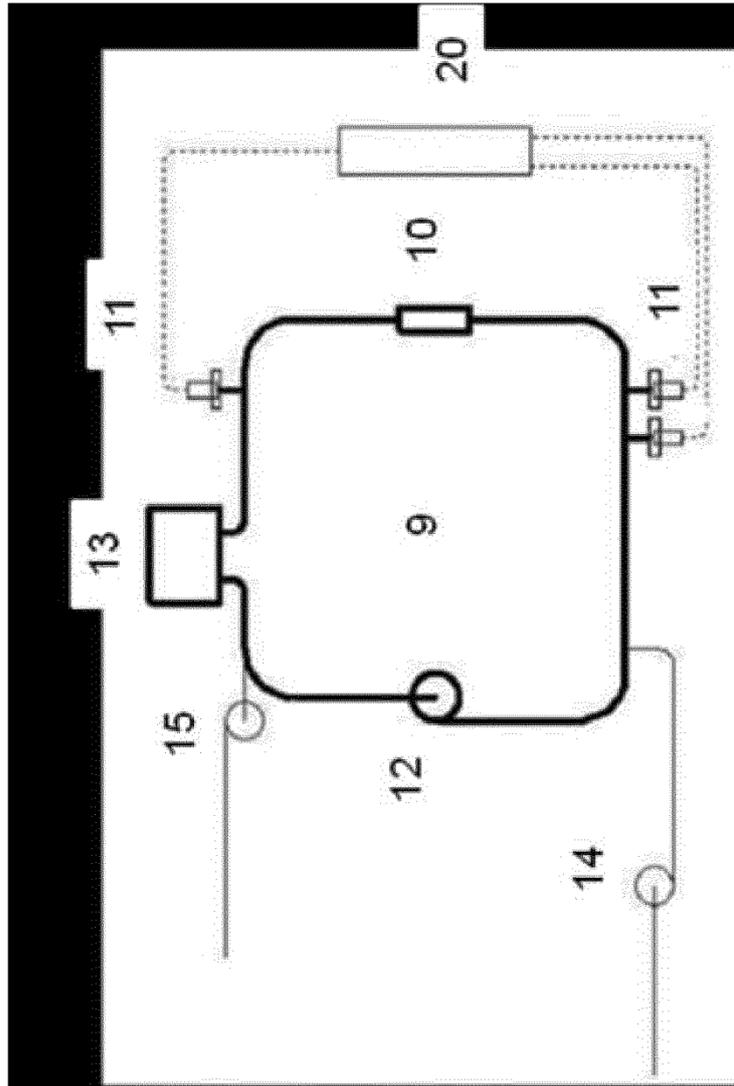
REIVINDICACIONES

- 5 1. Un armazón adecuado para la proliferación de tejido *in vivo* formado por una matriz de superficies de crecimiento interconectadas definidas por la interconexión de múltiples fibras o estructuras tridimensionales y espaciadas a intervalos regulares iguales o mayores que 0,7 mm y menores que 3,0 mm, estando, la interconexión de múltiples fibras o estructuras tridimensionales, dispuesta de manera uniforme, para crear áreas abiertas.
2. Un armazón de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el armazón está formado por una matriz de superficies de crecimiento interconectadas espaciadas a intervalos regulares alrededor de un soporte central.
- 10 3. Un armazón de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las superficies de crecimiento interconectadas están espaciadas a intervalos regulares iguales o mayores que 0,9 mm y menores que 3,0 mm.
4. Un armazón de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las superficies de crecimiento interconectadas están espaciadas a intervalos regulares iguales o mayores que 1,0 mm y menores que 3,0 mm.
- 15 5. Un armazón de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las superficies de crecimiento interconectadas están espaciadas a intervalos regulares iguales o mayores que 1,0 mm y menores que 2,0 mm.
6. Un armazón de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el armazón es biodegradable.









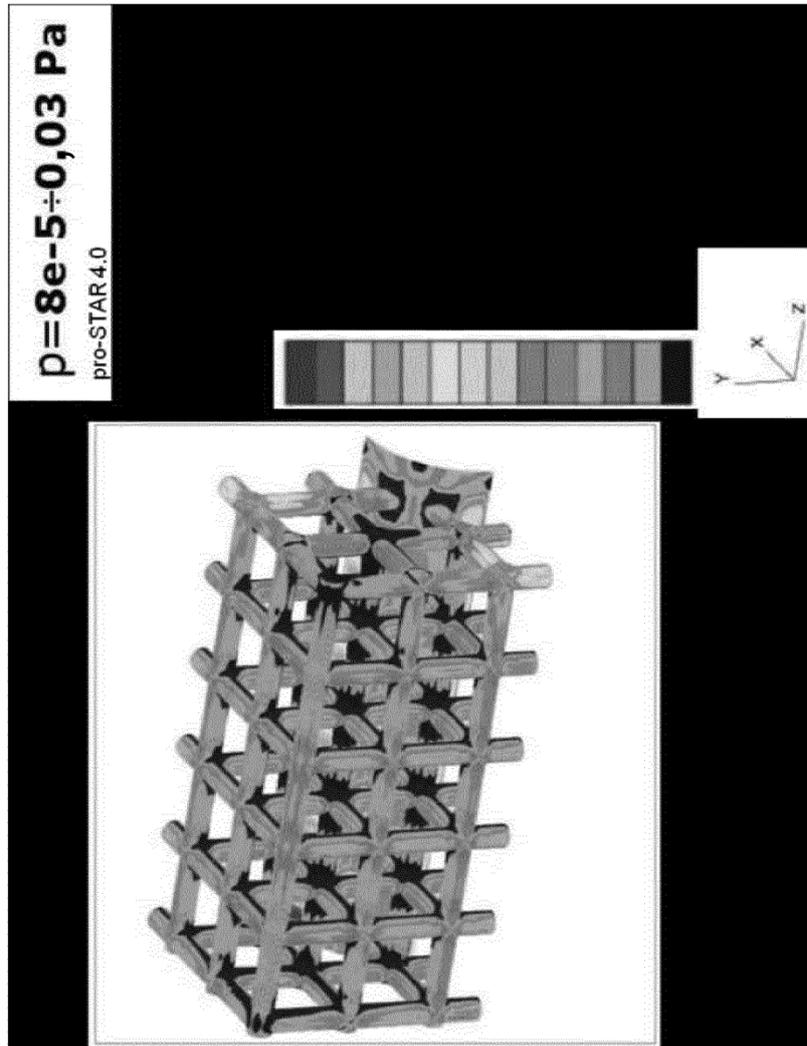


Fig. 6

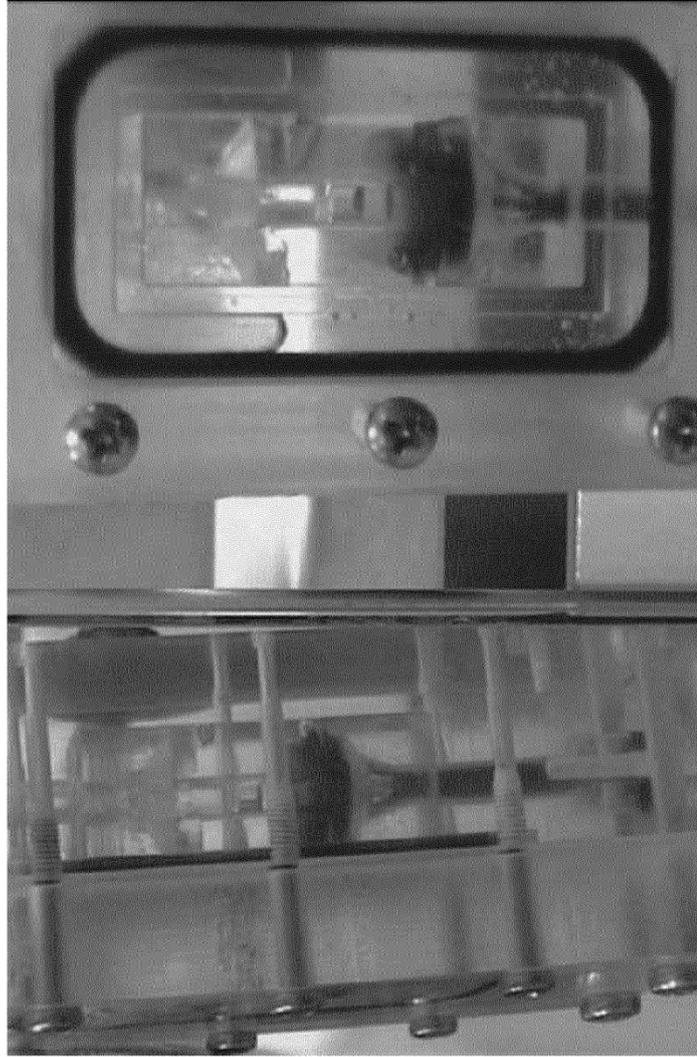


Fig. 7

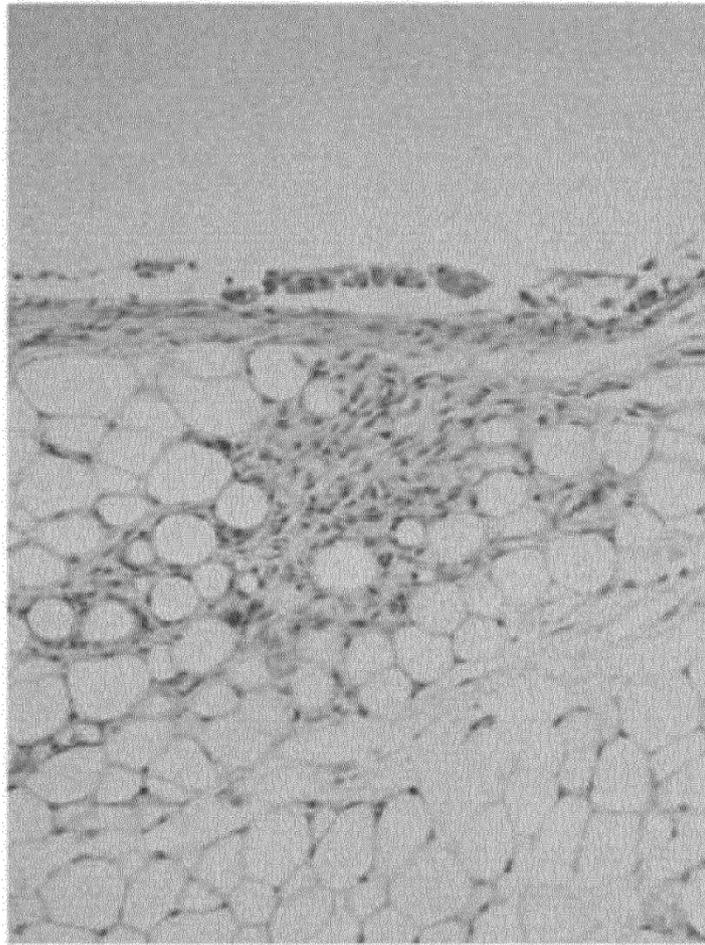


Fig. 8

