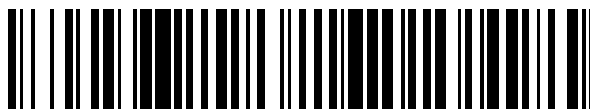


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 778 029**

51 Int. Cl.:

A61B 17/52	(2006.01) G01N 33/543	(2006.01)
A61N 2/00	(2006.01) G01N 33/58	(2006.01)
A61K 41/00	(2006.01)	
A61L 27/18	(2006.01)	
A61L 27/38	(2006.01)	
A61L 27/50	(2006.01)	
B03C 1/01	(2006.01)	
B03C 1/034	(2006.01)	
B03C 1/30	(2006.01)	
C12N 5/00	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.06.2013 PCT/US2013/045246**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **19.12.2013 WO13188449**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.06.2013 E 13805049 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2020 EP 2861167**

54 Título: **Matriz extracelular magnética**

30 Prioridad:

14.06.2012 US 201261659970 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.08.2020

73 Titular/es:

**GREINER BIO-ONE NORTH AMERICA, INC.
(100.0%)
4238 Capital Drive
Monroe NC 28110 , US**

72 Inventor/es:

SOUZA, GLAUCO R.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 778 029 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 extracelular magnética

5 **ÁMBITO DE LA PRESENTE INVENCION**

La presente invención se refiere a los materiales y a los métodos de preparación y empleo de una matriz extracelular magnética. El alcance de la presente invención se define en las reivindicaciones. Cualquier referencia a los métodos de tratamiento en esta descripción se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención destinados a un método para el tratamiento terapéutico del cuerpo humano (o animal).

ANTECEDENTES DE LA PRESENTE INVENCION

La matriz extracelular o "MEC" es la parte extracelular del tejido animal. Debido a su diversa naturaleza y composición la MEC puede cumplir muchas funciones, entre ellas la de proporcionar soporte, separar tejidos entre sí, regular la comunicación intercelular y el comportamiento dinámico de la célula. Para complicar aún más las cosas, la estructura y la composición de la MEC varían constantemente como respuesta a la actividad metabólica reinante en la población celular residente, a las demandas mecánicas del tejido y a las condiciones preponderantes del nicho microambiental. Este concepto de "reciprocidad dinámica" entre la MEC y la población celular residente es una ventaja principal del uso de materiales soporte de MEC respecto al empleo de materiales sintéticos y destaca la importancia de conservar en la mayor medida posible la composición nativa y su ultraestructura al preparar armazones tridimensionales.

Los componentes de la MEC son producidos intracelularmente por células residentes y secretados (y/o acumulados) en la MEC por exocitosis o por muerte celular. Una vez secretados se agregan a la matriz existente. La MEC consta de una malla entrelazada de glicosaminoglicanos (GAG) y proteínas fibrosas, que se analizan a continuación.

Los GAG son carbohidratos poliméricos y generalmente están unidos a proteínas de la matriz extracelular para formar proteoglicanos (el ácido hialurónico es una excepción notable; véase más abajo). Los proteoglicanos tienen una carga negativa neta que atrae iones sodio cargados positivamente (Na^+), los cuales a su vez atraen moléculas de agua por ósmosis, manteniendo la MEC y las células residentes hidratadas. Los proteoglicanos pueden contribuir asimismo a atrapar y almacenar factores de crecimiento dentro de la MEC.

En la matriz extracelular se encuentran diferentes tipos de proteoglicanos. El heparán sulfato (HS) es un polisacárido lineal que existe en todos los tejidos animales. Se halla en forma de un proteoglicano (PG) en el cual hay dos o tres cadenas de HS unidas muy cerca de la superficie celular o de las proteínas de la matriz extracelular. Es en esta forma como el HS se une a una gran variedad de ligandos proteicos y regula una amplia diversidad de actividades biológicas, incluidos los procesos de desarrollo, angiogénesis, coagulación sanguínea y metástasis tumoral.

En la matriz extracelular, especialmente en las membranas basales, las proteínas multidominio perlecan, agrina y el colágeno XVIII son las principales proteínas a las que está unido el heparán sulfato.

Los sulfatos de condroitina favorecen la resistencia a la tracción del cartílago, de los tendones, de los ligamentos y de las paredes de la aorta. También es sabido que afectan a la neuroplasticidad.

Los sulfatos de queratán tienen un contenido variable de sulfato y, a diferencia de muchos otros GAG, no llevan ácido urónico. Se encuentran en la córnea, el cartílago, los huesos y los cuernos de los animales.

El ácido hialurónico (o "hialuronano") es un polisacárido compuesto alternativamente por restos de ácido D-glucurónico y N-acetilglucosamina y, a diferencia de otros GAG, no existe como proteoglicano. En el espacio extracelular, el ácido hialurónico confiere a los tejidos la capacidad de resistir la compresión porque, absorbiendo cantidades importantes de agua, proporciona una fuerza contra la turgencia (hinchazón). Así, el ácido hialurónico se encuentra en abundancia en la MEC de las articulaciones de carga. También es un componente principal del gel intersticial. El ácido hialurónico se encuentra en la superficie interna de la membrana celular y está translocado fuera de la célula durante la biosíntesis. Actúa como una señal ambiental que regula el comportamiento celular durante el desarrollo embrionario, los procesos de curación, la inflamación y el desarrollo tumoral, e interactúa con un receptor transmembrana específico, CD44.

Los colágenos son la proteína más abundante en la MEC de la mayoría de los animales. De hecho el colágeno es la proteína más abundante en el cuerpo humano y representa el 90% del contenido de proteínas de la matriz ósea. Los colágenos se hallan en la MEC como proteínas fibrilares y dan soporte estructural a las células residentes. El colágeno se exocita como una forma precursora (procolágeno), que luego es escindida por las proteasas de procolágeno para permitir el ensamblaje extracelular.

El colágeno se puede dividir en varias familias según los tipos de estructura que forman:

- Fibrilar (tipos I, II, III, V, XI)
- Facit (tipos IX, XII, XIV)
- De cadena corta (tipos VIII, X)

- Membrana basal (tipo IV)
- Otros (tipos VI, VII, XIII)

Las elastinas, al contrario que los colágenos, proporcionan elasticidad a los tejidos, permitiendo que se estiren cuando sea necesario y luego vuelvan a su estado original, lo cual es útil para los vasos sanguíneos, los pulmones, la piel y el ligamento nual. Estos tejidos contienen elevadas cantidades de elastinas. Las elastinas son sintetizadas por los fibroblastos y las células musculares lisas. Son muy insolubles, y las tropoelastinas se secretan dentro de una molécula de chaperona que libera la molécula precursora tras entrar en contacto con una fibra de elastina madura. Luego las tropoelastinas se desaminan para incorporarse a la cadena de elastina.

Las fibronectinas son unas glicoproteínas que conectan las células con las fibras de colágeno en la MEC, permitiendo que las células se muevan a través de la MEC. Las fibronectinas se unen al colágeno y a las integrinas de la superficie celular, reorganizando el citoesqueleto y facilitando el movimiento de las células. Las células secretan las fibronectinas en forma desplegada e inactiva. La unión a las integrinas despliega las moléculas de fibronectina permitiéndoles formar dímeros para poder funcionar correctamente. Las fibronectinas también ayudan en el sitio de la lesión tisular uniéndose a las plaquetas durante la coagulación de la sangre y facilitando el movimiento de las células hacia el área afectada, durante la curación de la herida.

Las lamininas son proteínas que se encuentran en las láminas basales de prácticamente todos los animales. En vez de formar fibras similares al colágeno, las lamininas forman redes de estructuras similares a membranas que resisten las fuerzas de tracción en la lámina basal. También contribuyen a la adhesión celular. Las lamininas se unen a otros componentes de la MEC tales como colágenos, nidógenos y entactinas.

Muchas células se unen a componentes de la matriz extracelular. La adhesión celular puede tener lugar de dos modos, por adhesiones focales, conectando la MEC a los filamentos de actina celular, y por hemidesmosomas, conectando la MEC a filamentos intermedios como la queratina. Esta adhesión de las células a la MEC está regulada por moléculas de adhesión celular (MAC), que son específicas de la superficie de las células y se conocen como integrinas. Las integrinas son proteínas de la superficie celular que unen las células a estructuras de la MEC tales como la fibronectina y la laminina, y también a proteínas de integrina en la superficie de otras células.

Las fibronectinas se unen a macromoléculas de la MEC y facilitan su unión a las integrinas transmembrana. La unión de fibronectina al dominio extracelular inicia las vías de señalización intracelular, así como la conexión al citoesqueleto mediante un conjunto de moléculas adaptadoras como la actina.

En una gran cantidad de tipos de tejidos hay muchas clases de células que contribuyen a desarrollar los diversos tipos de matriz extracelular. No obstante, los fibroblastos son el tipo de célula más frecuente en la MEC de tejido conjuntivo, en el cual sintetizan, mantienen y constituyen un marco estructural. Los fibroblastos también secretan los componentes precursores de la MEC, incluida la sustancia fundamental. Otros tipos de células incluyen células madre, así como condrocitos y osteoblastos, entre otros. Los condrocitos se hallan en el cartílago y producen la matriz cartilaginosa. Los osteoblastos son responsables de la formación de hueso.

La MEC tiene gran interés médico y científico porque puede servir para preparar un almacén destinado al crecimiento y la regeneración de tejidos. Como la MEC nativa guía el desarrollo, la reparación y la regeneración fisiológica de los órganos, supone una alternativa prometedora a los almacenes sintéticos y una base para los esfuerzos regenerativos.

Hay estudios recientes de estos últimos años que han confirmado la importancia de la MEC en la regulación de la diferenciación de las células madre en tejido maduro. Muchos de los factores responsables de la influencia de la MEC en las células madre están relacionados con sus propiedades, incluida la estructura, la composición, la elasticidad y la integridad de la matriz. Como estas propiedades de la MEC suelen ser específicas del tipo de tejido, para desarrollar células diferenciadas de las células madre con fines terapéuticos, la capacidad de generar tipos específicos de MEC puede ser de gran valor para regular los entornos de las células madre (Reilly, 2010).

Uno de los cambios recientes de paradigma en la biología de las células madre ha sido el descubrimiento de que las células madre pueden empezar a diferenciarse en células tisulares maduras cuando se exponen a características intrínsecas de la matriz extracelular (MEC) tales como su estructura elasticidad y composición. Es sabido que estos parámetros modulan las fuerzas que una célula puede ejercer sobre su matriz. Las vías mecano-sensibles convierten luego estas señales biofísicas en señales bioquímicas que asignan la célula a un linaje específico. Al igual que los bien estudiados factores de crecimiento, los parámetros de la MEC son sumamente dinámicos y están controlados espacial y temporalmente durante el desarrollo, lo cual sugiere que juegan un papel morfogenético en la orientación de la diferenciación y organización de las células. Es probable que nuestra capacidad de regular dinámicamente el nicho de las células madre tal como ocurre naturalmente en el cuerpo sea un requisito crítico para desarrollar células diferenciadas de las células madre con fines terapéuticos.

La MEC se ha preparado extrayendo un tejido apropiado y descelularizándolo por medios químicos y/o enzimáticos de lisis celular, y/o por medios físicos de extracción de células, por ejemplo mediante un flujo forzado sobre o a través del tejido. Sin embargo estos métodos requieren mucho tiempo, su rendimiento es bajo y normalmente un paciente no

puede proporcionar dicho tejido, por lo cual hay que recurrir a cadáveres o tejidos de animales. Por consiguiente la metodología existente no es ideal.

Otro método de preparación de MEC consiste en obtenerla a partir de células cultivadas. Se han empleado células cultivadas en monocapa para preparar MEC, pero la técnica es difícil y los rendimientos son muy bajos. Además, los cultivos 2D no reflejan de forma completa y precisa la organización y la estructura de la MEC nativa, por lo cual estos métodos no son ni mucho menos ideales.

Aunque algunos de estos enfoques son prometedores, todavía hay margen para mejorar los métodos de preparación y uso de MEC, evitando algunas de los inconvenientes del estado técnico previo y proporcionando una MEC lo más parecida posible a la MEC nativa, con un rendimiento elevado.

RESUMEN DE LA PRESENTE INVENCION

Aquí presentamos nuevos armazones biomiméticos tridimensionales que pueden usarse terapéuticamente para tratar enfermedades. La presente invención aprovecha el método de cultivo 3D desarrollado por Nano3D Biosciences™ Inc. y utiliza esos métodos para realizar cultivos 3D que sirvan para preparar una MEC magnética.

En la solicitud de patente WO2010036957, de Nano3D Biosciences®, las células se levitan en un campo magnético poniéndolas en contacto con un "hidrogel" que contiene un bacteriófago con nanopartículas que responden a un campo magnético. En concreto se usan fagos filamentosos, tales como los bacteriófagos fd, fl o M13. El funcionamiento del método no está totalmente claro, pero se supone que el fago proporciona una estructura o ensamblaje similar a un gel que recubre las células y de algún modo ayuda a las células a absorber o adsorber las nanopartículas magnéticamente sensibles. Así, aunque el hidrogel se elimina por lavado, las células siguen respondiendo magnéticamente y pueden ser levitadas en un campo magnético apropiado.

Aunque la mayor parte del hidrogel se elimine por lavado, la infectividad por fagos o la posibilidad de transferencia de material genético subsiste y, por lo tanto, es conveniente proporcionar un material que permita la absorción o adsorción celular sin el uso de fagos. Así, la patente WO2011038370, también de Nano3D Biosciences®, describe un ensamblaje de nanopartículas de segunda generación que evita totalmente el uso de bacteriófagos para habilitar la magnetización de las células. Además, Nano3D Biosciences® (Houston TX) dispone actualmente de una variación del ensamblaje de nanopartículas reivindicado, con la marca comercial NANOSHUTTLE™. Este nuevo material magnético brinda un método superior para magnetizar las células sin el empleo de agentes tóxicos o infecciosos, de manera que las células permanezcan magnetizadas tras eliminar el material por lavado. La patente WO2010/123500 describe la preparación de una MEC descclularizada, que consiste en incorporar células a un armazón, cultivar el armazón celularizado para permitir la producción de la MEC y eliminar las células.

Ahora se ha visto que la tecnología NANOSHUTTLE™ puede usarse para preparar MEC magnéticas, y la levitación magnética se puede emplear como una herramienta para ayudar a descclularizar y tratar la MEC. Este nuevo hallazgo es la base de las diversas invenciones descritas en este documento.

En términos generales el método incluye el desarrollo de células en cultivos 3D, usando nanopartículas magnéticas. Las nanopartículas magnéticas son absorbidas por las células y finalmente terminan en la MEC; lo cual permite que la MEC pueda ser levitada magnéticamente y/o separada de la estructura multicelular. De este modo la MEC se puede mantener en su lugar usando un imán y el cultivo 3D se descclulariza empleando cualquier metodología conocida para producir una MEC magnética libre de células, que luego puede servir para cualquiera de los diversos usos en que se puede emplear la MEC.

Los pasos generales incluyen:

1. Tratamiento de las células, mezclas celulares o fragmentos de tejido con NANOSHUTTLE™ o cualquier otra solución de nanopartículas magnéticas, de manera que las células absorban las nanopartículas magnéticas.
2. Se realiza un cultivo celular 3D para procurar que las células generen una MEC resultante de la formación de estructuras multicelulares 3D. Preferiblemente se lleva a cabo una levitación magnética de las células o mezclas celulares por su capacidad de generar rápidamente estructuras multicelulares 3D y estos cultivos 3D se desarrollan hasta alcanzar el tamaño deseado. En este paso se pueden emplear otros métodos de cultivo 3D, como reactores rotativos, armazones, gota colgante, superficies no adherentes, matraces de fondo redondo o cualquier biorreactor de cultivo de células 3D, siempre que las células absorban las nanopartículas magnéticas.
3. Descclularización del cultivo 3D por cualquier método químico, enzimático y/o físico.
4. Recuperación de la MEC magnética, una vez descclularizada, separando magnéticamente los desechos, o por cualquier otro método de recuperación.
5. Eliminación de los surfactantes u otras sustancias químicas, lavando la MEC sostenida magnéticamente o por cualquier otro método de lavado.
6. Los pasos 1 - 5 se pueden repetir tantas veces como sea preciso, si es conveniente o necesario enriquecer o aumentar la cantidad de MEC acumulada en las nanopartículas magnéticas. Esto se consigue retirando células o tejidos frescos en el paso 1 mediante el producto de MEC magnetizado resultante del paso 5.
7. Volver a sembrar la MEC y destinarla luego al uso deseado.

Aquí se revelan varias formas de ejecución (párrafos [0040]-[0046]). Sin embargo solo forman parte de la presente invención las formas de ejecución representadas en las reivindicaciones.

- Una MEC magnética o MC magnética sembrada producida por cualquier método aquí descrito.
- 5 – Un método para preparar una MEC magnética, que consiste en introducir nanopartículas magnéticas en una célula, levitar dicha célula en un campo magnético y desarrollar en un cultivo celular 3D dicha célula levitada en dicho campo magnético, y descelularizar dicho cultivo celular 3D para producir una MEC magnética.
- Un método para preparar una MEC magnética, que consiste en mezclar células con una composición que contiene una nanopartícula magnéticamente sensible para que las células absorban dicha nanopartícula magnéticamente sensible, levitar dichas células magnéticas en un campo magnético, desarrollar en un cultivo celular 3D las células levitadas en dicho campo magnético, y descelularizar dicho cultivo celular 3D para producir una MEC magnética.
- 10 – Un método para preparar una MEC magnética, que consiste en mezclar células con una composición que contiene una nanopartícula cargada negativamente, una nanopartícula cargada positivamente y una molécula de soporte, de modo que una de dichas nanopartículas con carga negativa o positiva contenga un elemento magnéticamente sensible, y que dicha molécula de soporte mantenga dicha nanopartícula de carga negativa y dicha nanopartícula de carga positiva en una mezcla íntima; levitar dichas células en un campo magnético y desarrollar en un cultivo celular 3D dichas células levitadas en dicho campo magnético; y descelularizar dicho cultivo celular 3D con el fin de obtener una MEC magnética.
- 15 – Un método de preparación de un tejido para ser implantado en un paciente, que consiste en combinar células con nanopartículas magnéticas que sean absorbidas por dichas células; exponer dichas células a un campo magnético de manera que dichas células se unan y leviten; desarrollar dichas células para que formen un cultivo celular 3D; descelularizar dicho cultivo celular 3D para lograr una MEC magnética; sembrar dicha MEC magnética con células madre alógenas o células progenitoras de un paciente; cultivar dicha MEC sembrada en un campo magnético; y trasplantar la MEC sembrada a dicho paciente. Si se desea, las células originales también pueden ser del paciente, pero esto no es indispensable, ya que la MEC está casi totalmente descelularizada.
- 20
- 25

Otras formas de ejecución consisten en sembrar dicha MEC magnética con células y cultivar en un campo magnético dicha MEC sembrada; sembrar dicha MEC magnética con células fibroblásticas y células madre o progenitoras, y luego cultivar en un campo magnético dicha MEC sembrada; sembrar dicha MEC magnética con células epiteliales y células madre o células progenitoras, y luego cultivar en un campo magnético dicha MEC sembrada; sembrar dicha MEC magnética con células osteoblásticas y células madre o progenitoras, y luego cultivar en un campo magnético dicha MEC sembrada; sembrar dicha MEC magnética con células fibroblásticas autólogas, células epiteliales y células madre o progenitoras de un paciente, y luego cultivar en un campo magnético dicha MEC sembrada; o sembrar dicha MEC con células madre o células progenitoras de dicho paciente y luego cultivar en un campo magnético dicha MEC sembrada, así como variaciones y combinaciones de las mismas.

En las formas de ejecución preferidas, las células originales y/o las células de resiembra pueden proceder de cualquier fuente adecuada, p.ej. de líneas celulares o de células alógenas, o de combinaciones de las mismas. Se prefieren las células alógenas de un paciente más joven, pues es sabido que las células madre se amplifican con mayor facilidad cuando se emplea una MEC preparada a partir de animales más jóvenes. Las células pueden obtenerse en forma de un fragmento de tejido, o en forma de un fragmento de tejido extraído de un paciente.

El tipo y el número de células necesarias para la recelularización varían significativamente según el órgano, y también con el tamaño y la complejidad de la MEC, pues los fragmentos de tejido son más simples que los órganos enteros. Preferiblemente los tipos de células elegidos son los que serían necesarios para el tejido en cuestión, p.ej. osteoblastos para el tejido óseo, etc. Las células parenquimatosas, responsables de las funciones específicas del órgano, son de obvia necesidad, p.ej. hepatocitos para el hígado, cardiomiocitos para el corazón, epitelios para los pulmones, etc. Además las células no parenquimatosas como los fibroblastos y las células endoteliales potencian el fenotipo funcional de las células parenquimatosas y contribuyen a organizar la arquitectura celular del tejido. Las células endoteliales son importantes para proporcionar una barrera no trombótica a la matriz del órgano descelularizado y asegurar que el flujo sanguíneo in vivo se limite a los espacios vasculares y que las células parenquimatosas estén protegidas de la tensión de cizalladura producida por el flujo. Los fibroblastos, que secretan y remodelan la MEC, son muy importantes y mejoran las funciones de las células parenquimatosas en los cultivos mixtos. Recientemente se ha demostrado que los fibroblastos también están implicados en las propiedades eléctricas del miocardio al acoplarse a los cardiomiocitos y ayudar a la propagación de los estímulos eléctricos a distancias más largas.

Dependiendo del órgano también pueden ser valiosos, si no necesarios, otros tipos de células para la recelularización funcional. Hasta la fecha, la creciente complejidad de tratar con múltiples tipos de células ha limitado prácticamente los estudios basados en cultivos mixtos al uso de células endoteliales y fibroblastos. Tratar una mezcla de células es un problema combinatorio y, como en el caso de las vejigas producidas por ingeniería tisular, puede ser necesaria una prueba al azar o ensayos exhaustivos para encontrar el protocolo óptimo de siembra y cultivo.

Las células se pueden levitar empleando cualquier nanopartícula magnética que pueda ser absorbida por la célula o introducida en ella, p.ej. mediante chorro, inyección, electroporación, transducción, liposomas catiónicos, hidrogeles, presión magnética y similares. Se avanza que servirá cualquier medio de introducción, aunque los medios de captación

activa, como los descritos a continuación, pueden ser los que menos perturben la célula y por tanto preferibles.

En las formas de ejecución preferidas las células se levitan con una composición que comprende: a) una nanopartícula cargada negativamente, b) una nanopartícula cargada positivamente y c) una molécula soporte, donde una de dichas nanopartículas cargadas negativa o positivamente contiene un material magnéticamente sensible, como hierro u óxido de hierro, y donde dicha molécula soporte sostiene dicha nanopartícula cargada negativamente y dicha nanopartícula cargada positivamente en una mezcla íntima.

La composición más preferida es NANOSHUTTLE™, pues es sabido que funciona y está disponible comercialmente en Nano3D BioSciences (Houston TX).

Además, tal como se describe en patentes anteriores, se pueden realizar cultivos 3D de formas variadas modificando la configuración del campo magnético. Por ejemplo, se puede utilizar un imán anular o en forma de aro o rosquilla para realizar un cultivo 3D. También se pueden usar campos magnéticos para mantener o cambiar dicha forma durante los procesos de descelularización y recelularización.

La MEC se puede preparar a partir del cultivo 3D por cualquier método conocido del estado técnico, que incluye pero no se limita al tratamiento con surfactantes, detergentes no iónicos, detergentes iónicos, detergentes dipolares, a los tratamientos con álcali, ácido, proteasas, nucleasas, endonucleasas, exonucleasas, por presión osmótica, mediante soluciones hipertónicas, soluciones hipotónicas, por congelación-descongelación, perfusión, sonicación, agitación y combinaciones de ellos. El cultivo 3D se puede trocear o cortar rodajas, en dados o fragmentar antes del tratamiento, o se puede descelularizar intacto.

La MEC magnética se puede usar en cualquiera de los métodos en que se emplea una MEC, pero tiene una aplicación particular cuando está resembrada y desarrollada en un cultivo 3D levitado magnéticamente. Por ejemplo, la MEC se puede sembrar con células madre de un paciente y también con otros tipos de células apropiados para la aplicación, y el cultivo 3D resultante se puede utilizar en varias terapias celulares o tisulares.

La MEC magnética se puede usar asimismo para estudiar componentes de la MEC y/o diferenciar tipos de células, y a tal fin, cualquiera de los componentes de la MEC (o de las células) se puede marcar, p.ej., con anticuerpos, GFP, etiquetas fluorescentes y similares.

Aquí se pueden emplear las siguientes abreviaturas:

Abreviatura	Definición
BrEpic	Bronquial epitelial
CHAPS	3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propansulfonato
CML	Células de músculo liso
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol – colorante fluorescente de ácidos nucleicos
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DSS	Dodecil sulfato sódico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FAO	Fosfatasa alcalina ósea
FDNN	Fibroblastos dérmicos neonatales humanos
FPH	Fibroblasto primario humano
MEC	Matriz extracelular
MMec	MEC magnética
MMec-FPH	MEC magnética a partir de células FPH
MS	Molécula soporte
NP-	Nanopartícula cargada negativamente
NP+	Nanopartícula cargada positivamente
pNPP	p-Nitrofenil fosfato
NS	NANOSHUTTLE™
PBS	Suero fisiológico tamponado con fosfato
P/E	Penicilina/Estreptomicina
PL	Poli-lisina
REH	Riñón embrionario humano
SBF	Suero bovino fetal
TA	Temperatura ambiente
TX100	Triton-X100

Aquí incluimos como “cultivo” los cultivos de tipos de células individuales o los cultivos mixtos de más de un tipo de células.

Tal como se emplea aquí, una "MEC magnética" es una matriz extracelular que ha sido descelularizada y contiene suficientes nanopartículas magnéticas íntimamente mezcladas con ella, de modo que dicha MEC pueda levitar en un campo magnético.

- 5 Tal como se emplea aquí, el término "descelularizada" significa que al menos se ha eliminado el 95% de las células, preferiblemente el 98%, el 99% o más.

10 Tal como se usa aquí, una "nanopartícula cargada positivamente" o "nanopartícula positiva" se define como cualquier partícula de tamaño inferior a 200 nm, preferiblemente inferior a 100 nm o menos, que tiene una carga total positiva. Preferiblemente, la partícula no es tóxica, aunque esto no es indispensable porque las partículas no permanecen con las células.

15 Tal como se usa aquí, una "nanopartícula cargada negativamente" o "nanopartícula negativa" se define como cualquier partícula de tamaño inferior 200 nm, preferiblemente inferior a 100 nm, y con mayor preferencia de aproximadamente 2-25 nm, que tiene una carga total negativa. La partícula no es tóxica, pero ello no es obligatorio porque las partículas no permanecen con las células durante un largo periodo de tiempo.

20 Tal como se usa aquí, "elemento magnéticamente sensible" puede ser cualquier elemento o molécula que responda a un campo magnético. Como se detalla a continuación, una de las nanopartículas debe contener o ser un elemento magnéticamente sensible.

25 Tal como se usa aquí, "molécula soporte" se refiere a cualquier molécula grande que interactúe con las nanopartículas para crear una especie de tejido en forma de estructura fibrosa o gel que mantiene la nanopartícula magnética muy cerca de la célula para su absorción.

Aquí incluimos como "célula madre" células toti- y multipotentes, a no ser que se indique específicamente otra cosa.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 30 Fig. 1. Esquema de un proceso de descelularización utilizando un solo tipo de célula.
Fig. 2. Esquema de un proceso de descelularización utilizando dos tipos de células separadas en un proceso secuencial, de modo que el tipo de célula A se usa para realizar un cultivo 3D y así generar una MEC A, que luego se utiliza para tratar el tipo de célula B. El producto final será una MEC A magnética modificada adicionalmente con MEC B. Por supuesto también se podría preparar una mezcla de MEC A y B cultivando, conjuntamente células
35 de tipo A y B en el cultivo 3D inicial, y tal método sería preferible.

DESCRIPCIÓN DE FORMAS DE EJECUCIÓN DE LA PRESENTE INVENCION

- 40 En términos generales la presente invención consiste en una MEC magnética y en métodos para prepararla y usarla. Se utiliza un material magnético que permita a las células absorber o adsorber elementos magnéticamente sensibles y por tanto sean levitables en un cultivo celular cuando se aplica un campo magnético.

45 En las formas de ejecución elegidas los materiales magnéticos son nanopartículas cargadas positiva y negativamente, una de las cuales debe llevar uno o más elementos magnéticamente sensibles, como óxido de hierro nanométrizado. Estas nanopartículas se combinan luego con un polímero, preferiblemente con un polímero celular u otra molécula grande que actúa como soporte (aquí denominado "molécula soporte") de las nanopartículas cargadas y las células, manteniendo las nanopartículas en su lugar para poder ser absorbidas o adsorbidas por las células. La inclusión de nanopartículas positivas y negativas permite una mezcla íntima de las nanopartículas y promueve el ensamblaje de los tres componentes, asegurando así una distribución uniforme y una buena absorción. La molécula soporte combina
50 íntimamente los tres componentes con las células en una estructura similar a un tejido fibroso que permite que las células absorban el elemento magnéticamente sensible.

55 Tras un periodo de incubación el material magnético se puede eliminar por lavado, lo cual permite manipular las células en un campo magnético. Normalmente las células han perdido las nanopartículas magnéticas al cabo de 8 días, pero ahora sabemos que son retenidas por la MEC, lo cual permite preparar y disponer de una MEC magnética. Se puede descelularizar un cultivo celular 3D intacto por cualquier método conocido, o se pueden descelularizar fragmentos de un cultivo 3D troceado dependiendo del uso final de la MEC. La MEC magnética se puede sembrar con las células deseadas, por ejemplo con células madre autólogas, y cultivar en un entorno 3D muy natural.

60 El elemento magnéticamente sensible puede ser cualquier elemento o molécula que responda a un campo magnético, p.ej. imanes de tierras raras (p.ej. de samario cobalto (SmCo) y neodimio hierro boro (NdFeB)), materiales magnéticos cerámicos (p.ej. estroncio ferrita) y elementos magnéticos (p.ej. hierro, cobalto y níquel y sus aleaciones y óxidos). Se prefieren sobre todo materiales paramagnéticos que reaccionen a un campo magnético, sin ser propiamente imanes, ya que esto facilita el ensamblaje de los materiales.

65 Preferentemente, el campo magnético utilizado para levitar tales células o la MEC magnético es de aproximadamente

300 G-1000 G. Sin embargo, la intensidad del campo varía con la distancia desde el cultivo y con la cantidad y el tipo de elemento magnéticamente sensible absorbido o adsorbido por la MEC. Por lo tanto la intensidad de campo óptima es variable, pero se determina empíricamente con facilidad.

- 5 Las nanopartículas cargadas negativamente incluyen metales estabilizados por la carga (p.ej. plata, cobre, platino, paladio), pero preferiblemente son nanopartículas de oro.

10 Las nanopartículas cargadas positivamente incluyen aleaciones y/u óxidos estabilizados o recubiertos por surfactantes o polímeros (p.ej. hierro elemental, hierro-cobalto, óxido de níquel), y preferiblemente son nanopartículas de óxido de hierro.

Una de las dos nanopartículas debe ser magnéticamente sensible, pero obviamente una de las dos (o ambas) puede tener esta característica.

- 15 Las nanopartículas deben tener un tamaño de escala nanométrica y por tanto son de aproximadamente 100 nm. No obstante, el tamaño puede variar entre aproximadamente 5-250 nm, 50-200 nm, 75-150 nm, e incluso pueden ser más pequeñas o más grandes, siempre que el tamaño sea apropiado para permitir la entrada o adsorción del tipo de célula empleado. En otro trabajo hemos demostrado que hay un límite superior para el tamaño efectivo de la nanopartícula magnética y que el tamaño micrométrico es demasiado grande para la efectividad, aunque todavía se observó cierta funcionalidad.

25 La "molécula soporte" es generalmente un polímero u otra molécula grande que sirve para mantener las nanopartículas y las células juntas en íntimamente mezcladas. La molécula soporte puede tener carga positiva, carga negativa, carga mixta o neutra, y puede haber combinaciones de más de una molécula soporte.

30 Como ejemplos de dichas moléculas soporte cabe mencionar polímeros naturales tales como péptidos, polisacáridos, ácidos nucleicos y equivalentes, pero también se pueden emplear polímeros sintéticos. Entre las moléculas soporte mayormente preferidas cabe citar poli-lisina, fibronectina, colágeno, laminina, ASB, hialuronano, glicosaminoglicano, glicosaminoglicano aniónico no sulfatado, gelatina, ácido nucleico, mezclas proteicas de matriz extracelular, matrigel, anticuerpos y mezclas y derivados de los mismos.

35 En general la concentración de la molécula soporte es mucho mayor que la concentración de las nanopartículas con carga negativa y positiva, y oscila entre 10-1000 veces más, 20-500 o 50-200 veces más. Sin embargo, son posibles proporciones mayores o menores, dependiendo de qué tipo de célula, de molécula soporte y de nanopartículas se estén empleando. Cuanto más largo sea el polímero, menor proporción será necesaria para formar una estructura que sea suficiente para mantener las nanopartículas en su lugar para la absorción.

40 Generalmente se usan unas concentraciones muy bajas de nanopartículas. Las concentraciones pueden variar entre 10^{-12} - 10^{-6} molar, pero están preferiblemente en el rango nanomolar, y las concentraciones de la(s) molécula(s) soporte pueden variar entre 10^{-9} - 10^{-3} molar, y están preferiblemente en el rango micromolar.

45 Los tres componentes se acoplan por interacción electrostática y por tanto se prefieren moléculas soporte cargadas o de carga mixta como la poli-lisina. No obstante, cualquiera de los tres componentes se puede funcionalizar, derivar o recubrir para promover aún más la interacción de los componentes y/o las células. Así, uno o más miembros se pueden funcionalizar, derivar o recubrir con un anticuerpo que p.ej. se una a un antígeno de la superficie celular. De este modo las interacciones entre los componentes y/o las células se favorecerían todavía más. Otros pares de unión incluían receptores-ligandos, biotina-estreptavidina, ácidos nucleicos complementarios, aglutinina de germen de trigo (AGT), moléculas con contenido de ácido siálico y similares.

50 Los recubrimientos también pueden ser protectores o pasivantes, sobre todo para las nanopartículas, tales como PVP, dextrano, ASB, PEG y similares. Las nanopartículas, en particular las que llevan el elemento magnéticamente sensible, pueden estar marcadas para su visualización, p.ej. con un fluoróforo, un radiomarcador o similar, en concreto durante el revelado y las pruebas in vitro de células y tejidos magnetizados. Sin embargo, para usos terapéuticos es preferible omitir tales marcadores.

55 En otras formas de ejecución las composiciones incluyen la MEC magnética sola o junto con las células que deben cultivarse conjuntamente con ella, incluyendo, pero sin limitarse a ellas, células madre o células progenitoras, células cancerosas, células primarias, células de mamífero, células humanas (sobre todo células autólogas), células extraídas directamente de tejidos frescos, bacterias, levaduras, células vegetales o mezclas de las mismas.

60 Si se desea, el ensamblaje de nanopartículas magnéticas puede estar libre de moléculas biológicas tales como fagos o productos celulares, porque las moléculas soporte, como la poli-lisina, se pueden sintetizar fácilmente. Sin embargo, en general todos los componentes son atóxicos, económicos o fáciles de preparar. Además, las estructuras similares a tejidos fibrosos permiten la incorporación de moléculas adicionales de soporte celular (tales como componentes de matriz extracelular) para ser incluidas en los ensamblajes magnéticos de nanopartículas.

65

Magnetizar células con ensamblajes de nanopartículas magnéticas consiste solo en añadir el ensamblaje a las células en medios habituales de cultivo celular. Las células pueden magnetizarse en pocos minutos a partir del tratamiento con las nanopartículas magnéticas (5 minutos) y se pueden tratar células fijadas o suspendidas con los ensamblajes de nanopartículas magnéticas. Las células se pueden cultivar hasta alcanzar el tamaño deseado, y luego el cultivo 3D se puede descelularizar para producir MEC magnética.

El cultivo 3D se puede iniciar con cualquier célula, mezcla de células o fragmentos de tejido. Se pueden utilizar líneas celulares, células heterólogas o preferiblemente autólogas. Luego la MEC magnética resultante preparada a partir de los cultivos 3D se puede volver a sembrar con los tipos de células deseados, en particular con células autólogas de un paciente, de manera que algunas células obtenidas del paciente se puedan amplificar y cultivar en un cultivo celular 3D muy natural sobre una matriz MEC existente. El cultivo 3D final se puede usar en terapias celulares y tisulares, y tal vez incluso para el trasplante de órganos en el futuro.

Por ejemplo, la MEC se puede preparar mediante un cultivo 3D de diversas líneas celulares procedentes de tejido cardíaco y/o de diversos tipos de células cardíacas alogénicas, y de MEC preparada según los métodos de la presente invención. Luego la MEC se puede sembrar con fibroblastos, células endoteliales, células madre, células progenitoras, células madre pluripotentes inducibles procedentes de un adulto y similares, del propio paciente, y se puede tratar con los factores de crecimiento apropiados para incentivar la diferenciación en cardiomiocitos, músculo liso vascular y células endoteliales, etc. El tejido resultante se puede implantar y emplear para reparar el músculo cardíaco dañado. Como la MEC se cultiva partiendo de los tipos de células más fácilmente disponibles, pero descelularizada y sembrada con una variedad de células autólogas, incluidas algunas células madre y progenitoras, el método tiene la ventaja de proporcionar una MEC natural y fácilmente disponible, que luego puede servir de armazón para cultivar células raras, pero seguras, procedentes del paciente y regenerar así un tejido viable y sano para implantes.

En nuestros ensayos se combinaron 0,5 ml de NANOSHUTTLE™ con 5 ml de fibroblastos primarios humanos y células de músculo liso. Esta mezcla se mezcló suavemente con una pipeta y se dejó incubar y sedimentar durante 5 minutos. Las células se pasaron luego a una placa de Petri de 3,5 cm y se levitaron con un imán de neodimio de forma anular (20 x (8,5 x 4,5) x 7 mm; fuerza de tracción: 13 libras). Todas las células levitaron y coalescieron en un cultivo 3D a los pocos minutos de aplicar un campo magnético

Después las células se cultivaron durante 4 días en medio DMEM con SBF al 10%. Después del cultivo se efectuó la descelularización siguiendo técnicas conocidas (véanse abajo los métodos marcados con asterisco), pero utilizando un imán para levitar y mantener la MEC, mientras se eliminaban los desechos por lavado. La MEC final se tiñó con DAPI, lo cual indicó que la MEC carecía de ADN (no representado), y se tiñó positivamente para colágeno y laminina (no representado).

A continuación se relaciona una amplia variedad de técnicas de preparación de la MEC que se pueden emplear en la presente invención:

1.	Congelar a -80°C y descongelar a TA. Repetir este ciclo seis veces. Sumergir en disolución acuosa de NH ₄ OH 25 mM durante 20 minutos y lavar con agua MilliQ.
2.	Tratar con Triton-X100 0,1% y KCl 1,5 M en tampón Tris 50 mM (pH 8,0) durante 6 horas. Lavar con tampón Tris 10 mM (pH 8,0) y agua MilliQ.
3.	Congelar a -80°C y descongelar a TA. Repetir este ciclo seis veces. Lavar con agua MilliQ.
4.	Sumergir en NH ₄ OH 25 mM durante 1 hora y lavar con agua MilliQ.
5.	Sumergir en TX100 0,1% en tampón Tris 50 mM (pH 8,0) durante 6 h. Lavar con tampón Tris 10 mM (pH 8,0) y agua MilliQ.
6.	Incubar en KCl 1,5 M durante 6 h y luego en agua MilliQ durante 6 h. Repetir tres veces. Lavar con agua MilliQ.
7.	6 ciclos de congelación a -80°C y descongelación a TA. Tres ciclos de shock osmótico de NaCl 3M a H ₂ O. Lavar con agua MilliQ.
8.	* 5 lavados con CHAPS 8 mM, NaCl 1 M y EDTA 25 mM en PBS (10 mM a pH 7,4), 10 lavados con PBS, incubar por la noche a 37°C con PBS + SBF al 10% + penicilina/estreptomicina al 10%; incubar el tejido con benzonasa (nucleasa, 90 U/ml, Sigma-Aldrich) a 37°C durante 1 hora; 5 lavados con PBS + SBF al 10% + penicilina/estreptomicina al 10%; guardar la MEC descelularizada a 4°C en PBS + SBF al 10% + penicilina/estreptomicina al 10%.
9.	* Enjuagar los fragmentos de tejido 5X con PBS (10 mM pH 7,4), 5 lavados en PBS isotónico + 1% (p/v) de Triton X-100; resuspender pipeteando suavemente 5X; 5 lavados con PBS isotónico + 2% (p/v) de Triton X-100; resuspender pipeteando suavemente 5X; agitar la muestra durante la noche con PBS isotónico + 3% (p/v) de Triton X-100; 5 lavados con PBS isotónico + 3% (p/v) de Triton X-100; 5 minutos de incubación en Tritón al 2% entre lavados; resuspender pipeteando suavemente 5X; 10 lavados con PBS que contiene 0,1% (p/v) de SDS; 10 lavados con PBS; tratamiento con benzonasa como anteriormente, lavar y guardar.
10.	Congelar a -80°C 6 h; descongelar en H ₂ O desionizada 8h; perfundir H ₂ O desionizada; luego PBS 37°C 2 h; 0,02% de tripsina, 0,05% de EDTA, 0,05% de NaN ₃ 2 h; 4% de desoxicolato 2 h; 0,1% de ácido peracético; 4% de EtOH 1 h.
11.	Adenosina 10 mM 15 min; DSS al 1% 12 h; Triton X-100 al 1% 30 min; PBS con antibióticos 124 h.

12. CHAPS 8 mM, NaCl 1 M, EDTA 25 mM 2 h; PBS con antibióticos; 90 U/ml de benzonasa; PBS con 10% de SBF
13. SDS al 0,1% 120 min; Triton X-100 al 1% 10 min; PBS con antibióticos 72 h.
14. Congelar a -80°C 24 h; tripsina al 0,02% 2 h; Tritón X al 3% 18-24 h; ácido peracético 1 h
15. Congelar -80°C; PBS a 4°C durante la noche; DSS al 0,01% 24 h; DSS al 0,1% 24 h; DSS al 1% 24 h; Triton X-100 al 1% 30 min; ácido peracético al 0,1% 3 h.
16. Lavado - PBS y congelar 1 semana; congelar/descongelar 24 h; lavado - DMEM 48 h; DSS al 11% 5 semanas; ADNasa 24 h.

Las técnicas de siembra empleadas actualmente para recellularizar la MEC incluyen la inyección de células en la MEC, la siembra de dosis bajas por perfusión y la siembra de bolos múltiples con perfusión. Esto también se puede lograr simplemente mezclando células con MEC magnetizada. Véase la fig. 1, que ilustra la magnetización de las células y el desarrollo de un cultivo 3D que finalmente produce una MEC magnética apta para ser descelularizada según las técnicas conocidas. Aunque en la fig. 1 se representa el uso de un solo tipo de célula para el cultivo 3D, aquí también podría emplearse una mezcla de tipos de células.

El proceso también puede servir para enriquecer o modificar la MEC magnetizada y purificada con células del mismo tipo o de un tipo diferente, respectivamente, tal como se representa en la fig. 2, lo cual se conseguiría recellularizando la MEC magnética preparada como en la fig. 1 con el tipo de célula B, y luego repitiendo el proceso para generar una MEC mixta de dos tipos de célula.

Se realizó una serie de ensayos para demostrar la utilidad de la MEC magnética y su valor para contribuir a que las células se desarrollen de una manera más robusta y natural. Uno fue un ensayo de cicatrización de heridas y el otro un ensayo de diferenciación ósea, en el cual el desarrollo óseo se indicó por el nivel de fosfatasa alcalina ósea.

Para preparar una matriz descelularizada destinada al ensayo de cicatrización de heridas se trataron matraces T75 de FPH con NanoShuttle™ (8 ml/cm² de área superficial) a fin de incubarlos durante la noche. Al día siguiente, los FPH se separaron de su sustrato y se levitaron en placas de 6 pocillos a una concentración de 2,8 millones de células/pocillo en 2 ml de medio (DMEM con suero bovino fetal, SBF, al 10% y 1% de penicilina/estreptomicina, P/E) y se desarrollaron en cultivos 3D durante 2 días.

Luego los cultivos se descelularizaron gradualmente con concentraciones crecientes de Triton X-100 (1%, 2%, 3%) en PBS e incubando durante la noche con Triton X-100 al 3%. A continuación se lavaron los cultivos con DSS al 0,1% en PBS, luego con PBS solo, antes de deshacerlos mecánicamente pipeteando e incubarlos durante la noche a 37°C con 90 U/ml de benzoasa en PBS con 1% de P/E. Al día siguiente los cultivos descelularizados se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en un volumen de PBS igual al volumen total de NanoShuttle añadido a los matraces. Esto proporciona una MEC magnética de células FPH (MMec-FPH) para usarla en los siguientes ensayos.

Luego observamos el efecto de la MMec-FPH en la capacidad de curación de heridas de los FDNN. Se incubaron frascos T75 de FDNN con NanoShuttle™ (8 ml/cm² de área superficial). Al día siguiente las células se separaron del sustrato y se contaron. A una placa separada de 96 pocillos posada sobre una matriz de 96 imanes anulares añadimos unos volúmenes de MMec-FPH en proporciones de 0-2:1 respecto a los volúmenes correspondientes a la cantidad de NanoShuttle™ en 200.000 células. Se permitió que la MMec-FPH formara un patrón en el fondo del pocillo durante 15 minutos. A continuación se agregaron 200.000 células a cada pocillo y se dejaron posar durante otros 15 minutos. Luego se eliminó el campo magnético y se midió el área del anillo durante 1400 minutos, representándola gráficamente frente al tiempo y la concentración. Encontramos que a concentraciones crecientes de MMec-FPH, el anillo de células se podía cerrar a mayor velocidad (tabla 1). Por lo tanto, la MEC magnética de células FPH mejoró la cicatrización de heridas por los FDNN.

Tabla 1: cicatrización de heridas por FDNN	
Relación MMec-FPH:NS	Relación de anillo/cierre de heridas
2,00	1,17
1,67	0,82
1,33	1,59
1,00	0,75
0,67	0,78
0,33	0,58

A continuación estudiamos si la MEC magnética de FPH contribuía a diferenciar los FDNN en un fenotipo óseo. Los frascos T75 de FDNN se trataron con NanoShuttle™ solo, con MMec-FPH solo, o con NanoShuttle™ combinado 1:1: con MMec-FPH (8 ml/cm² de área superficial) para incubar durante la noche. Al día siguiente, los FDNN se separaron de su sustrato y se levitaron en placas de 24 pocillos a una concentración de 200.000 células/pocillo en 400 ml de medio. Los FDNN se dividieron luego entre cultivos con medios DMEM y cultivos con medios osteógenos (DMEM con 10% de SBF, 1% de P/E, β -glicerofosfato 10 mM, dexametasona 100 nM, 50 mg/ml de ácido ascórbico).

Los FDNN tratados con NanoShuttle™ y los FDNN sin tratar se cultivaron al mismo tiempo en placas 2D con cualquiera

de los dos tipos de medios. Los cultivos se mantuvieron durante 6 días, cambiando los medios cada 2 días. Al cabo de los 6 días los cultivos 3D se homogeneizaron en Triton X-100 al 2% en PBS y luego se centrifugaron a 4°C durante 15 minutos a 10.000 g. Los cultivos 2D se lavaron de manera análoga en Triton X-100 al 2% en PBS y después se centrifugaron a 4°C durante 10 minutos a 2.500 g. Los sobrenadantes se recogieron y se analizaron usando un kit de ensayo de fosfatasa alcalina ósea (SensoLyte®).

La fosfatasa alcalina ósea (FAO) es la isoforma de fosfatasa alcalina específica del hueso y el cambio de actividad de la fosfatasa alcalina está implicado en varios sucesos fisiológicos y patológicos, tales como el desarrollo óseo, las enfermedades de tipo óseo, las enfermedades relacionadas con la gestación y las enfermedades inflamatorias del intestino. La fosfatasa alcalina también es un enzima popular, conjugado con un anticuerpo secundario para ELISA. Se ha demostrado que el fosfato de p-nitrofenilo (pNPP) es un sustrato cromógeno eficaz para el fosfato alcalino.

Las muestras de los sobrenadantes se dividieron en alícuotas y el sustrato de fosfatasa alcalina, pNPP, se añadió a una concentración 1:1. Se mezclaron las soluciones y después se leyeron las absorbancias de las muestras en un espectrofotómetro a una absorbancia de 405 nm.

Los resultados se indican en la tabla 2 y confirman que la adición de MMec-FPH a cultivos 3D con medios osteógenos aumentó la actividad de la FAO respecto a aquellos cultivos 3D sin matriz descelularizada, o con una relación 1:1 de NanoShuttle:MMec-FPH y medios osteógenos. Por consiguiente la adición de MMec-FPH aumentó el desarrollo óseo y mejoró la diferenciación de FDNN hacia un fenotipo óseo en cultivo 3D.

Tabla 2: actividad de la FAO (respecto al control 2D no tratado, sin medios osteógenos)			
		Medios osteógenos	
		-	+
3D	+ MMec-FPH	0,265	0,402
	+ NS/MMec-FPH	0,239	0,315
	+ NS	0,222	0,274
2D	+ NS	0,805	1,511
	Sin tratar	1	1,229

En futuros ensayos caracterizaremos y evaluaremos el rendimiento de la MEC magnética en comparación con las células cultivadas solo con Nanoshuttle. Evaluaremos la eficacia de las células cultivadas en nuestra MEC magnética respecto a las células tratadas con Nanoshuttle. Este ensayo incluirá la determinación del rendimiento de las células levitadas frente a las no levitadas, al tratarlas con MEC magnética o con Nanoshuttle. A continuación evaluaremos el nivel de las citocinas inflamatorias IL-6 e IL-8 en el sobrenadante de cultivos tratados y levitados respecto al sistema de control consistente en cultivos monocapa y células tratadas y levitadas solo con Nanoshuttle.

También investigaremos el efecto del tiempo de levitación sobre la composición de la MEC magnética, sondando las proteínas de la MEC por inmunohistoquímica y/o electrotransferencia (Western blot). Asimismo identificaremos la MEC magnética generada a partir de un solo tipo de célula, de más de un tipo de célula levitada y cultivada conjuntamente al mismo tiempo, y de dos tipos de células, una de las cuales genera el primer lote de MEC magnética (MEC magnético A) destinada al tratamiento de un segundo tipo de célula (MEC magnética B) que se levita para modificar de nuevo la MEC magnética original (figura 2).

Por último evaluaremos si la MEC magnética tiene algún efecto en la regulación de la diferenciación de células madre preadipocíticas (fibroblastos 3T3) en adipocitos, frente a las células tratadas/levitadas solo con nanoshuttle y en 2D. Esto se llevará a cabo induciendo la diferenciación en adipocitos de las células levitadas (tratadas con MEC magnética y NANOSHUTTLE™) y monocapas (tratadas y no tratadas con MEC magnética y NANOSHUTTLE™). Anticipamos que nuestra MEC magnética proporcionará un entorno favorecedor y fácilmente obtenible para que las células madre se desarrollen y diferencien de forma correcta, con el fin de producir diversos tipos de tejido.

En esta descripción se ha hecho referencia a los siguientes documentos:

- Lu H. y otros, Comparison of decellularization techniques for preparation of extracellular matrix scaffolds derived from three-dimensional cell culture [*Comparación de técnicas de descelularización para preparar armazones de matriz extracelular procedentes del cultivo celular tridimensional*], J Biomed. Mater. Res. 00A:000-000 (2012) (vista previa del artículo disponible en línea).
- Reilly, G.C. & Engler, A.J., Intrinsic extracellular matrix properties regulate stem cell differentiation [*Las propiedades intrínsecas de la matriz extracelular regulan la diferenciación de células madre*], J. Biomech. 43(1): 55-62(2010).
WO2010036957 y WO2011038370
WO2006060171

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar una MEC magnética, que consiste en:
 - a) combinar células con una composición que contenga una nanopartícula magnética, de manera que dichas células absorban dicha nanopartícula magnética;
 - b) levitar dichas células en un campo magnético;
 - c) desarrollar dichas células levitadas en dicho campo magnético, en un cultivo celular 3D que contiene una MEC, de manera que las nanopartículas magnéticas se desprenden de las células y son retenidas por dicha MEC durante la levitación y el crecimiento de las células levitadas en el campo magnético; y
 - d) descelularizar dicho cultivo celular 3D para producir una MEC magnética.
2. El método de la reivindicación 1, en el cual dichas nanopartículas magnéticas se introducen mediante chorro, inyección, electroporación, presión magnética, hidrogeles o liposomas catiónicos.
3. El método de la reivindicación 1, en el cual dicha composición contiene:
 - i) una nanopartícula cargada negativamente,
 - ii) una nanopartícula cargada positivamente, y
 - iii) una molécula soporte;
 de manera que una de dichas nanopartículas con carga negativa o positiva contenga un elemento magnéticamente sensible, y que dicha molécula de soporte mantenga dicha nanopartícula de carga negativa y dicha nanopartícula de carga positiva mezcladas íntimamente.
4. El método de la reivindicación 3, en el cual además a) la molécula soporte es de péptidos, polisacáridos, ácidos nucleicos, polímeros, poli-lisina, fibronectina, colágeno, laminina, ASB, hialuronano, glicosaminoglicano, glicosaminoglicano aniónico no sulfatado, gelatina, ácido nucleico, mezclas proteicas de matriz extracelular, anticuerpos o mezclas de los mismos; b) dicha nanopartícula cargada negativamente es una nanopartícula de oro, y c) dicha nanopartícula cargada positivamente es una nanopartícula de óxido de hierro.
5. El método de la reivindicación 1, que además consiste en sembrar dicha MEC magnética con células y cultivar dicha MEC sembrada en un campo magnético.
6. El método de la reivindicación 1, que además consiste en sembrar dicha MEC magnética con fibroblastos y/o células epiteliales y/u osteoblásticas, más células madre y/o células progenitoras, y luego cultivar dicha MEC sembrada en un campo magnético.
7. El método de la reivindicación 1, en el cual dichas células se encuentran en forma de un fragmento de tejido extraído de un paciente.
8. El método de la reivindicación 7, que además consiste en sembrar dicha MEC con células madre o progenitoras de dicho paciente, y luego cultivar dicha MEC sembrada en un campo magnético.
9. Un método de preparación de tejido para implantar en un paciente, que consiste en:
 - a) combinar células con nanopartículas magnéticas que sean absorbidas por dichas células;
 - b) exponer dichas células a un campo magnético, de manera que dichas células se aglutinen y leviten;
 - c) desarrollar dichas células para formar un cultivo celular 3D que contenga una MEC, en la cual las nanopartículas magnéticas se separen de las células y sean retenidas por dicha MEC durante la levitación y el cultivo de las células levitadas en el campo magnético;
 - d) descelularizar dicho cultivo celular 3D para obtener una MEC magnética;
 - e) sembrar dicha MEC magnética con células madre alógenas o células progenitoras de un paciente;
 - f) cultivar dicha MEC sembrada en un campo magnético; y
 - g) utilizar la MEC sembrada de la etapa f) para ser trasplantada a dicho paciente.
10. El método de la reivindicación 9, en el cual dichas nanopartículas magnéticas incluyen además:
 - i) una nanopartícula cargada negativamente,
 - ii) una nanopartícula cargada positivamente, y
 - iii) una molécula soporte;
 de manera que una de dichas nanopartículas con carga negativa o positiva contenga un elemento magnéticamente sensible, y que dicha molécula de soporte mantenga dicha nanopartícula de carga negativa y dicha nanopartícula de carga positiva mezcladas íntimamente.
11. El método de la reivindicación 9, en que dichas nanopartículas magnéticas se introducen en la célula mediante chorro, inyección, electroporación, presión magnética, hidrogeles o liposomas catiónicos.

FIG. 1

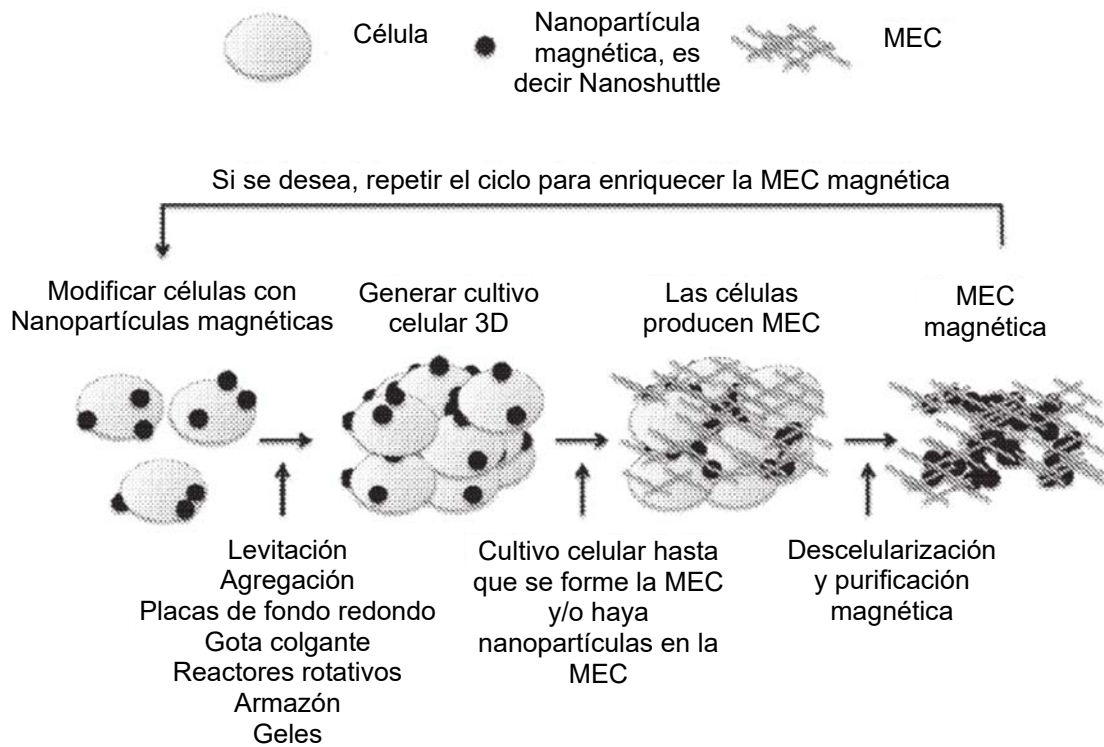


FIG. 2

