

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 803 242**

51 Int. Cl.:

**A61L 27/38** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.09.2016 PCT/EP2016/071114**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.03.2017 WO17042232**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2016 E 16760757 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.01.2020 EP 3347064**

54 Título: **Ingeniería tisular**

30 Prioridad:

**07.09.2015 GB 201515820**

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

**25.01.2021**

73 Titular/es:

**UCL BUSINESS LTD (100.0%)  
The Network Building, 97 Tottenham Court Road  
London W1T 4TP, GB**

72 Inventor/es:

**DECOPPI, PAOLO;  
URBANI, LUCA y  
URCIUOLO, ANNA**

74 Agente/Representante:

**MARTÍN SANTOS, Victoria Sofia**

**ES 2 803 242 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**

5 Ingeniería tisular

**Campo técnico**

10 La presente invención se refiere de forma general a procedimientos y materiales para su uso en la  
producción de implantes, particularmente implantes de tejido luminal, donde los implantes están concebidos  
mediante ingeniería al sembrar un andamio o matriz acelular con precursores de células musculares y  
fibroblastos. La presente invención proporciona procedimientos para producir construcciones de ingeniería  
15 tisular [o ingeniería de tejidos] para la implantación en un sujeto que pueden utilizar nuevos procesos de  
siembra descritos en este documento para un injerto y diferenciación celular mejorados.

**Antecedentes de la técnica**

20 El daño, la disfunción o la pérdida de tejidos u órganos es una característica de una amplia variedad de  
afecciones médicas. En algunas condiciones, el reemplazo del tejido u órgano dañado es la mejor o incluso  
la única opción.

25 Por ejemplo, la atresia esofágica es una afección médica congénita que afecta el tracto alimentario y que  
ocurre en aproximadamente 1 de cada 2500 nacimientos vivos. Hace que el esófago termine en una bolsa  
ciega en lugar de conectarse normalmente al estómago. El caso más grave de atresia esofágica a veces se  
denomina agenesia esofágica, donde no hay esófago. El tratamiento más inmediato y efectivo en la  
30 mayoría de los casos es una reparación quirúrgica para volver a conectar los dos extremos del esófago  
entre sí.

Los trasplantes de donantes humanos (ya sea vivos o cadavéricos) han tenido un éxito significativo, y los  
procedimientos como los trasplantes de hígado, corazón y riñón son cada vez más comunes. Sin embargo,  
35 la grave escasez de donantes, la complejidad de extraer órganos y entregarlos al receptor, y el potencial de  
transmisión de agentes infecciosos son deficiencias importantes de este enfoque, al igual que su  
aplicabilidad a pacientes pediátricos.

Tal como se explica por ejemplo, en el documento WO0214480, la ingeniería tisular [o ingeniería de tejidos]  
40 es un campo en evolución que busca desarrollar técnicas para cultivar tejidos y órganos de reemplazo en el  
laboratorio.

La estrategia general para producir tejidos de reemplazo utiliza células de mamíferos que se siembran en  
un sustrato apropiado para el cultivo celular. Las células se pueden obtener del receptor previsto (por  
45 ejemplo, de una biopsia), en cuyo caso a menudo se expanden en cultivo antes de usarse para sembrar el  
sustrato. Las células también se pueden obtener de otras fuentes (por ejemplo, líneas celulares  
establecidas). Después de la siembra, el crecimiento celular generalmente continúa en el laboratorio y / o  
en el paciente después de la implantación del tejido que se ha conseguido mediante ingeniería tisular.

50 Así, por ejemplo, el desarrollo de una construcción para la regeneración o sustitución de órganos lumbales  
dañados (como el esófago) necesita una combinación de andamio y de células para producir un tejido  
tridimensional funcional.

El documento WO0214480 describe métodos para producir una construcción de ingeniería tisular mediante  
el crecimiento de células in vitro en un sustrato y luego descelularizar la construcción para producir una  
55 construcción descelularizada que consiste principalmente en componentes de la matriz extracelular. Se  
informa que la construcción se puede usar inmediatamente o almacenar hasta que se necesite. La  
construcción descelularizada se puede usar para una ingeniería tisular adicional, que puede incluir el  
sembrar la construcción con células obtenidas del receptor al que va destinada la construcción.

60 Durante cualquiera de las fases de crecimiento requeridas para la producción de la construcción, la  
construcción en desarrollo puede estar sujeta a varias etapas de ingeniería tisular [ingeniería de tejidos],  
como la aplicación de estímulos mecánicos, incluidas las fuerzas pulsátiles. Los procedimientos también  
incluyen la producción de un tejido nativo concebido mediante ingeniería al extraer tejido de un animal o  
humano, realizando una o más etapas de ingeniería tisular en el tejido y sometiendo el tejido a la  
65 descelularización. El tejido nativo descelularizado y modificado se puede someter a otras etapas de la  
ingeniería tisular.

El documento WO2003092471 (también publicado como US2005/0202058) describe construcciones de injertos de tejido que incluyen un material de matriz extracelular en combinación con células endoteliales añadidas y al menos una población celular exógena añadida adicional.

5 El documento US2014/0341862 se refiere a un procedimiento para preparar una construcción de tejido para fines médicos que utiliza células progenitoras endoteliales (EPC por sus siglas en inglés de "*endothelial progenitor cells*") que no se han pasado [pasajes o subcultivos] varias veces y que tienen un contenido de células progenitoras endoteliales de crecimiento temprano (EOEC por sus siglas en inglés de "*early outgrowth endothelial progenitor cells*") y de células progenitoras endoteliales de crecimiento tardío (LOEC por sus siglas en inglés de "*late outgrowth endothelial progenitor cells*"). Estas células y fibroblastos y/o  
10 células musculares, a saber, mioblastos, miofibroblastos, células musculares lisas o sus progenitores, en forma de células vivas, se siembran en una matriz o se introducen en una matriz con el fin de producir la construcción del tejido después de pasar por otras etapas de tratamiento. La matriz es preferiblemente una preparación de proteínas, más particularmente una preparación de fibrinógeno.

15 El documento US 2004/0028662 se refiere a un proceso de colonización celular mediante el cual las células biológicas se colonizan en una matriz de tejido sintético o natural para obtener un implante de tejido o un trasplante de tejido. El crecimiento de las células se promueve mediante la adición de mediadores, factores o cofactores suministrados por las células cultivadas de forma conjunta.

20 El documento WO03/095631 se relaciona con células madre multipotentes, procedimientos para su aislamiento y expansión in vitro, procesos para su diferenciación in vitro, y su uso para regenerar o reparar tejidos biológicos.

25 En la Revista de Biociencias, Vol. 34, no. 6, 30 de noviembre de 2009, páginas 873-879, el artículo "Los andamios de poli (ácido L-láctico) porosos son sustratos óptimos para la colonización interna por mesoangioblastos A6 y análisis inmunocitoquímicos" ["*Porous poly (L-lactic acid) scaffolds are optimal substrates for internal colonization by A6 mesoangioblasts and immunocytochemical analyses*"] (F. CARFI-PAVIA, et al) describe la siembra de mesoangioblastos de ratón en matrices bidimensionales dentro de  
30 andamios porosos tridimensionales de poli (ácido L-láctico) (PLLA), en presencia o ausencia de un recubrimiento de colágeno tipo I.

Desafortunadamente, los enfoques existentes para las técnicas de siembra celular y las combinaciones celulares en la ingeniería tisular a menudo muestran un bajo injerto celular y la falta de una población homogénea de células en el andamio. Esto inhibe el desarrollo de un tejido funcional, particularmente tejido u órganos lumbinales.  
35

De este modo, se puede ver que los procedimientos novedosos para sembrar andamios de matrices para producir tejido u órganos lumbinales implantables con injerto celular mejorado o propiedades relacionadas proporcionarían una contribución a la técnica.  
40

### **Divulgación de la invención.**

45 Sorprendentemente, los inventores han demostrado que sembrar una combinación de precursores de células musculares y fibroblastos en un andamio o matriz de tejido para diseñar una construcción para la reparación o reemplazo de un órgano, de acuerdo con los procedimientos de la invención, puede mejorar el injerto celular y la colonización de la matriz 3D.

50 En realizaciones preferidas, se inyecta una combinación de fibroblastos y precursores de células musculares en la pared de un andamio para la ingeniería tisular esofágica. La inyección proporciona una distribución exitosa de la suspensión celular directamente dentro del andamio.

55 Sin desear limitarse a la teoría, se cree que el suministro de las dos poblaciones celulares descritas anteriormente permite el establecimiento de un efecto paracrino entre las dos líneas celulares. Lo anterior inesperadamente da como resultado un injerto celular mejorado, proliferación y migración / invasión a través del andamio, así como la diferenciación de los progenitores de células musculares hacia células musculares maduras. Además, la presencia de células musculares y fibroblastos imita la heterogeneidad de un tejido vital y la presencia de los dos tipos de células puede obviar la necesidad de agregar múltiples factores de crecimiento exógenos o moléculas de adhesión al cultivo.  
60

Además, sorprendentemente los inventores han descubierto que el uso de una proporción igual o superior de precursores de células musculares a fibroblastos proporciona una distribución homogénea de las células, al tiempo que reduce la posibilidad de crecimiento excesivo de los fibroblastos. El producto resultante, por lo tanto, refleja más de cerca el tejido natural y, por lo tanto, es deseable.  
65

5 Por consiguiente, se ha demostrado que el suministro de los tipos de células de acuerdo con los protocolos preferidos descritos en el presente documento proporciona una distribución más homogénea de las células a través de las diferentes capas del tejido y, por lo tanto, proporciona una construcción que es más similar al tejido nativo. La presente invención proporciona procedimientos para producir construcciones de ingeniería tisular para su implantación en el cuerpo, que utilizan nuevos procesos de siembra descritos en este documento para mejorar el injerto y la diferenciación celular. Estos y otros aspectos de la invención se describirán a continuación con más detalle.

10 El alcance de la invención está definido por las reivindicaciones. Cualquier referencia en la descripción a los procedimientos de tratamiento se refiere a los productos de la presente invención para su uso en un procedimiento de tratamiento.

15 En un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para producir una construcción de tejido u órgano, por ejemplo una construcción luminal u otra construcción de tejido hueco, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- (i) proporcionar un andamio o matriz acelular;
  - 20 (ii) sembrar una combinación de mesoangioblastos y fibroblastos en y/o sobre el andamio o matriz, en donde los mesoangioblastos y fibroblastos se siembran por separado, simultáneamente o secuencialmente; y
  - (iii) cultivar el andamio sembrado para producir una construcción implantable,
- 25 en donde la proporción de mesoangioblastos : fibroblastos usados para la siembra es de 50:50 a 99:1.

30 De acuerdo con la invención, la construcción de tejido u órgano comprende tejido de mamífero producido por proliferación y/o diferenciación de los mesoangioblastos y/o fibroblastos sembrados, preferiblemente por proliferación de ambos tipos de células y por diferenciación de los mesoangioblastos en y/o en el andamio previsto. El procedimiento de producción de la invención y, por lo tanto, la generación del tejido luminal o la construcción del órgano generalmente se realiza in vitro.

35 Sin embargo, se apreciará que puede producirse una mayor proliferación y/o diferenciación celular y generación del constructo después del implante *in vivo*. Por tanto, preferiblemente la producción de la construcción se realiza in vitro hasta que se genere una construcción que esté suficientemente poblada con células y/o donde las células precursoras (mesoangioblastos) estén suficientemente diferenciadas para permitir una implantación exitosa en un sujeto.

40 Posteriormente se puede producir una proliferación celular adicional en y/o en el andamio, por ejemplo después de la implantación. Por lo tanto, se apreciará que un andamio no necesita estar completamente poblado con las células sembradas para ser útil para la implantación en un sujeto (por ejemplo, es posible que el andamio tenga áreas donde las células sembradas no están presentes, por ejemplo, el andamio puede tener células sembradas en al menos 70, 80, 90, 95 o 99% de su superficie).

45 El tamaño y / o la forma del tejido u órgano generado puede ser típicamente representativo del tamaño / forma de la lesión y / o daño que se tratará en un sujeto o paciente que necesite dicho tejido u órgano.

50 Así, por ejemplo, si un sujeto carece de una parte de un tejido / órgano luminal, la construcción de tejido u órgano producida puede corresponder al tamaño / forma de la parte faltante. Alternativamente, la construcción de tejido u órgano generada puede ser de un tamaño mayor que el tamaño de la lesión / daño en el órgano luminal en un sujeto, por ejemplo de al menos 5, 10, 15, 20, 30, 40 ó 50% mayor y una construcción de este tipo más grande se puede implantar o la construcción se puede dimensionar / formar adecuadamente después de la producción. El tamaño y la dimensión de la construcción pueden depender además de la edad y el tamaño del sujeto receptor para la implantación.

55 La referencia a una construcción "luminal", o similar, se refiere a una construcción que es adecuada para el reemplazo o implantación en un órgano o tejido luminal, como los descritos a continuación, en lugar de estrictamente la estructura de la construcción misma. La referencia a las construcciones de tejido se debe entender en consecuencia. Por lo tanto, la referencia a una construcción esofágica se refiere a una construcción que es adecuada para la implantación en el esófago, o como un reemplazo esofágico, y una construcción intestinal se refiere a una construcción que es adecuada para la implantación en el intestino, o como un reemplazo intestinal.

65 En una realización, la construcción puede tener una forma luminal o tubular, si, por ejemplo, dicha construcción se va a usar para proporcionar una parte faltante o ausente del órgano luminal, o reemplazarlo por completo. Sin embargo, una construcción luminal no necesariamente tiene una forma luminal o tubular,

y tal y como se discutió anteriormente, la forma depende completamente del tejido que se va a reemplazar, insertar o reparar.

5 Tal y como se describió anteriormente, la construcción de tejido u órgano producida o generada comprenderá el andamio o matriz acelular (como un andamio descelularizado o un andamio polimérico) y una distribución homogénea de células (mesoangioblastos diferenciados / mesoangioblastos y fibroblastos no diferenciados). Opcionalmente, esto se puede modificar o combinar con otros medios para la conexión o el montaje en el cuerpo del receptor.

10 Además, la construcción de tejido u órgano puede comprender otros tipos de células, particularmente células epiteliales y / o endoteliales o de cresta neural. En una realización adicional, el procedimiento de la invención comprende una etapa adicional de sembrar células epiteliales en la construcción o en y / o en el andamio antes de la implantación.

15 Los términos "tejido" u "órgano" se usan indistintamente en este documento con respecto a la construcción, a menos que el contexto exija lo contrario.

20 Los protocolos para producir construcciones que contienen músculo liso fuerte y resistente descritos en este documento se pueden aplicar órganos luminales \ huecos (los términos se usan indistintamente a menos que el contexto exija lo contrario) tales como el esófago, la tráquea, los vasos sanguíneos, el intestino, la uretra, el colon, etc. La construcción de tejido u órgano producida por un procedimiento de la invención tiene una utilidad particular como construcción esofágica. Además, la construcción de tejido u órgano producida de acuerdo con el procedimiento anterior tiene una utilidad particular como construcción intestinal. Las construcciones producidas por los procedimientos de la invención (por ejemplo, construcciones esofágicas e intestinales) son particularmente adecuadas para el tratamiento de un recién nacido o un bebé.

30 Como se describió anteriormente, los inventores han encontrado sorprendentemente que la introducción de una proporción igual o superior de mesoangioblastos : fibroblastos da como resultado una distribución ventajosa homogénea de células en la construcción de tejido. Por lo tanto, en una realización preferida, una combinación de mesoangioblastos: fibroblastos dentro de los siguientes intervalos de proporciones 65:35 a 90:10; 70:30 a 90:10; 80:20 a 90:10; 83:17 a 88:12 para la introducción al andamio o matriz están incluidas. Preferiblemente, se puede usar una relación de mesoangioblastos: fibroblastos igual o mayor que 70:30, con una relación particularmente preferida de aproximadamente 85:15.

35 Se entenderá que una "combinación" de mesoangioblastos y fibroblastos se puede sembrar simultáneamente, secuencialmente o por separado. Por lo tanto, no se necesita introducir las células a la vez, y/o al mismo tiempo, y la "combinación" en este contexto no debería implicar la entrega simultánea de las células. El suministro secuencial puede implicar el suministro de las poblaciones celulares dentro de al menos 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50 ó 60 minutos entre sí, o dentro o alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 40 11, 12, 24, 36 ó 48 horas entre sí. Sin embargo, se prefiere el suministro simultáneo, en el que las células se introducen a la vez desde fuentes separadas o desde la misma fuente, donde las células se mezclan previamente preferiblemente en una proporción adecuada tal y como se describió anteriormente.

45 construcciones. La diferenciación de mesoangioblastos en células musculares se puede evaluar fácilmente mediante la medición del marcador SM22 u otros descritos en este documento.

50 En una realización adicional, se proporciona una construcción de tejido u órgano luminal que comprende un andamio, células de músculo liso, fibroblastos y opcionalmente que comprende mesoangioblastos, en donde preferiblemente las células de músculo liso y/o mesoangioblastos están presentes en una proporción de 50:50 a 99: 1 en comparación con los fibroblastos, más particularmente en una proporción o al menos 70:30 u 85:15.

55 Las construcciones de tejido producidas por el procedimiento de la invención se pueden usar para tratar a un sujeto que necesita reemplazo o reparación de un tejido u órgano, o que sufre daño y/o pérdida de tejido u órgano, usando una construcción de tejido u órgano de la invención, preferiblemente uno que incorpora células autólogas de ese individuo.

60 El término "sujeto" o "paciente" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier mamífero, por ejemplo un animal doméstico como un perro, gato, etc., un animal agrícola, como un caballo, cerdo o vaca, etc., o un ser humano. Particularmente, el sujeto o paciente puede ser un recién nacido o un bebé, particularmente un recién nacido humano o un bebé, por ejemplo, que padece atresia esofágica, por lo que la construcción es una construcción esofágica.

65 La referencia al reemplazo de un tejido u órgano se refiere al reemplazo de una parte o la totalidad de un tejido u órgano luminal, como los descritos anteriormente. Por lo tanto, el reemplazo de órganos se puede referir al reemplazo de, por ejemplo, al menos 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 ó 100% de un

órgano o tejido. Puede ser necesario el reemplazo de un órgano o tejido cuando falta el órgano o parte del mismo, está enfermo o dañado y/o cuando el órgano o parte del mismo no es funcional o tiene una función reducida.

5 Se pueden producir daños en los tejidos o en los órganos debido a una enfermedad, por ejemplo cáncer o exposición a un agente dañino, como un químico o calor, por ejemplo una quemadura. Por lo tanto, una parte o la totalidad del tejido u órgano se pueden dañar. Además, la "pérdida de tejido u órgano" puede ser el resultado del daño o puede estar presente, por ejemplo, antes del nacimiento (por ejemplo, un defecto congénito o una afección congénita). La pérdida de un tejido u órgano puede ser una pérdida parcial o completa del órgano o tejido.

10 Tal y como se discutió anteriormente, una construcción fabricada mediante los procedimientos de la invención se puede usar para tratar a un sujeto que necesita reemplazo de esófago o que sufre daño o pérdida esofágica. Tal procedimiento utiliza preferiblemente una construcción adecuada para la implantación en el esófago, por ejemplo uno que utiliza un andamio o matriz descelularizada derivada del esófago.

15 Las construcciones de tejido producidas por el procedimiento de la invención se pueden usar en el tratamiento de un sujeto que padece atresia o agenesia esofágica con una construcción de tejido u órgano luminal de la invención (por ejemplo, una construcción esofágica).

20 El término "atresia esofágica" se refiere a una afección en la que el esófago termina en una bolsa ciega que no está conectada al estómago y la "agenesia esofágica", y tal y como se usa en este documento, se refiere a un caso particularmente grave de atresia esofágica donde el esófago está completamente ausente.

25 Las construcciones de tejido producidas por el procedimiento de la invención se pueden usar para tratar el daño o la pérdida intestinal o se proporciona para tratar a un sujeto que necesita reemplazo intestinal, preferiblemente, mediante la administración de una construcción luminal de la invención (por ejemplo, una construcción intestinal, producida usando un andamio descelularizado del intestino).

30 Una construcción de tejido u órgano luminal implantable de la invención (por ejemplo, de acuerdo con los procedimientos de la invención) se puede usar para implantar la construcción o tejido en el cuerpo del individuo de acuerdo con procedimientos quirúrgicos estándar, por ejemplo, implantación o trasplante ortotópico.

35 Después de la implantación, las células del individuo pueden migrar al tejido *in vivo*, complementando la población celular sembrada. La migración de las células a la construcción se puede potenciar, por ejemplo, tratando el construcción con factores de crecimiento, agentes quimiotácticos u otros compuestos antes o después de la implantación.

40 Visto alternativamente, la invención proporciona una construcción de la invención para usar en el tratamiento de daño o pérdida de tejido u órgano o para reemplazo o reparación de tejido u órgano. En particular, la invención proporciona una construcción para su uso en el tratamiento de atresia esofágica o agenesia esofágica.

45 También se proporciona una construcción según la invención para su uso en cirugía.

50 También se proporciona una construcción de acuerdo con la invención en la fabricación de un producto para su uso en cirugía.

55 Cualquier subtítulo en este documento se incluye solo por conveniencia, y no debe interpretarse como que limita la divulgación de ninguna manera.

La invención se describirá ahora adicionalmente con referencia a las siguientes figuras y ejemplos no limitantes. A la luz de estos, a los expertos en la materia se les ocurrirán otras realizaciones de la invención.

60 La divulgación de todas las referencias citadas en el presente documento, en la medida en que se puedan utilizar por los expertos en la materia para realizar la invención, se incorporan aquí específicamente por referencia cruzada.

### Dibujos

65 Figura 1: Colocación del tubo NG y microinyección de fMABS en la pared muscular de la matriz esofágica en condiciones estériles.

Figura 2: Andamios microinyectados y sembrados en superficie, abiertos longitudinalmente y colocados en 24 placas de pocillos múltiples para cultivo estático.

Figura 3: Cámaras de cultivo utilizadas en el cultivo de construcciones.

5

Figura 4: Biorreactor y cámara de cultivo.

Figura 5: Implantación omental de andamios esofágicos sembrados en ratones inmunocomprometidos.

10

Figura 6: fMABS cultivado en medio proliferante expresados en marcadores AP y NG2. Cuando se cultivaron en medio de diferenciación del músculo esquelético, se fusionaron formando miotubos positivos para MF20 y que contenían núcleos positivos para MyoD. Los fMABS también mostraron marcadores de diferenciación de músculo liso cuando se cultivaron con medio específico que expresa SM22 y aSMA en cultivo.

15

Figura 7: Conteo de células (gráficos) de imágenes DAPI de andamio esofágico de rata sembrado con células administradas con Matrigel o medio a través de microinyecciones o siembra en superficie.

20

La eliminación de una "fracción sustancial" de las células se refiere a la eliminación de al menos 60, 70, 80, 90, 95 ó 99% de las células. La referencia a dejar la matriz "sustancialmente intacta" se refiere a retener la presencia de al menos 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 ó 99% de la matriz, por ejemplo de la ECM.

25

La invención proporciona además un procedimiento tal y como el que se ha descrito anteriormente, que incluye adicionalmente una etapa de obtención de un andamio o matriz mediante la descelularización de un sustrato apropiado (por ejemplo, los establecidos anteriormente, particularmente un sustrato derivado porcino).

30

El andamio puede tener típicamente cualquier forma o tamaño, particularmente puede corresponder al tamaño / forma del tejido que se requiere reemplazar, reparar o tratar en un sujeto. Alternativamente, el andamio puede ser más grande o incluso más pequeño que la lesión (puede ocurrir proliferación celular *in vivo*).

35

Después de la siembra de las células, en ciertas realizaciones de la invención, se permite que las poblaciones de células se adhieran a la matriz durante un período de tiempo antes de colocar el andamio sembrado en medio de cultivo. Se apreciará que puede que no sea necesario que todas las células sembradas se adhieran a la matriz. Sin embargo, en particular, al menos 60, 70, 80 ó 90% de las células sembradas se pueden adherir.

40

Además, como se explica en el documento WO0214480, se pueden aplicar varios tratamientos para mejorar la adherencia de las células al andamio. Los tratamientos apropiados se describen, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos de América número 5,613,982. Tales tratamientos incluyen la aplicación de diversas proteínas, por ejemplo, factores de crecimiento o proteínas de matriz extracelular al andamio o a la construcción en crecimiento. Por ejemplo, se pueden aplicar al sustrato colágeno, elastina, fibronectina, laminina o proteoglicanos. El sustrato se puede impregnar con factores de crecimiento o estos agentes se pueden proporcionar en el medio de cultivo.

45

50

En los procedimientos de la invención, la construcción sembrada de células se cultiva durante un período de crecimiento en un entorno adecuado para el crecimiento de las células para formar una construcción [concebida mediante] ingeniería.

55

Las condiciones de crecimiento apropiadas para células de mamífero en cultivo son bien conocidas en la técnica. Los medios de cultivo celular generalmente incluyen nutrientes esenciales y, opcionalmente, elementos adicionales como factores de crecimiento, sales, minerales, vitaminas, etc. Se pueden seleccionar ingredientes particulares para mejorar el crecimiento celular, la diferenciación, la secreción de proteínas específicas, etc. En general, el crecimiento estándar los medios incluyen Medio Eagle modificado de Dulbecco, bajo en glucosa (DMEM por sus siglas en inglés de "*Dulbecco's Modified Eagle Medium*"), con 110 mg/L de piruvato y glutamina, suplementado con 10 a 20% de suero fetal bovino (FBS por sus siglas en inglés de "*fetal bovine serum*") o son apropiados el suero de ternero y 100 U/mL de penicilina, así como lo son varios otros medios estándares bien conocidos por los expertos en la materia.

60

65

Preferiblemente, las células se cultivan en condiciones estériles en una atmósfera de aproximadamente 5% de CO<sub>2</sub> a una temperatura igual o cercana a la temperatura corporal del animal de origen de la célula. Por ejemplo, las células humanas se cultivan preferiblemente a aproximadamente 37 °C.

En general, la duración del período de crecimiento dependerá de la construcción de ingeniería tisular

- particular que se produzca. El período de crecimiento puede continuar hasta que la construcción haya alcanzado las propiedades deseadas, por ejemplo, hasta que la construcción haya alcanzado un espesor, tamaño, resistencia, composición de componentes proteicos, densidad celular o expresión de marcadores celulares apropiados, por ejemplo liso derivado de mesoangioblastos. Las células musculares deben expresar marcadores como SM22, alphaSMA, Calponina. Los procedimientos para evaluar estos parámetros se describen en la patente de los Estados Unidos de América número 5,613,982 y en los ejemplos a continuación.
- 5
- Normalmente, el cultivo de la construcción sembrada estará en un "bio reactor".
- 10
- Tal y como se analizó, por ejemplo en el documento US2014/0341862, los reactores adecuados para una muy amplia variedad de diferentes construcciones de tejidos son conocidos en la técnica anterior. Por ejemplo, para las construcciones tubulares son adecuados un reactor tal y como se representa en el documento DE 199 15 610 (Bader), o uno como se describe en el documento EP 0 320 441 (Sulzer). El vaso tubular se puede sujetar en un reactor de este tipo y, por lo tanto, someterse a un flujo continuo de medio o sangre, según se acerque más a la situación natural posterior de integración en el cuerpo. En los ejemplos a continuación, se ha demostrado que el cultivo dinámico es superior a las condiciones estáticas, por ejemplo, con respecto a la distribución y migración celular mejoradas.
- 15
- A través del flujo puede ser flujo continuo. El flujo continuo puede efectuarse de manera pulsátil para imitar la influencia de los latidos del corazón y la circulación sanguínea. Estas medidas pueden mejorar la resistencia mecánica de la construcción obtenida y estimular la organización de las células para producir un ensamblaje natural. Un sistema de cultivo dinámico preferido incorpora estimulación mecánica (cultivo "peristáltico") para mejorar el índice de injerto muscular. La solicitud de patente de los Estados Unidos de América número 09/109,427 describe cómo se puede usar una bomba en comunicación con el interior de un cuerpo en la cámara para proporcionar aumentos cíclicos en la presión para hacer que el cuerpo distensible se disuelva dentro del lumen de la construcción e imparta una fuerza de estiramiento pulsátil a la construcción.
- 20
- Este biorreactor puede incorporar un casete extraíble que se puede transferir desde un biorreactor de descelularización, someterse a siembra y luego introducirse en un biorreactor de recelularización.
- 30
- En uso, la construcción tubular se puede suturar a dos insertos (por ejemplo, vidrio o plástico) que permitan separar el compartimento interno y externo de la cámara. La cámara de cultivo (conectada al biorreactor y al depósito) se puede llenar con medio de proliferación en ambos compartimientos.
- 35
- La cámara se puede incubar en una condición estática antes de comenzar el flujo en la cámara interior para el cultivo dinámico.
- 40
- Después de un período de tiempo (por ejemplo, aproximadamente 24 o 48 horas) de cultivo, el medio se puede cambiar de medio de proliferación a un medio de diferenciación tanto en la cámara como en el depósito; por ejemplo, un protocolo preferido es de alrededor de 1 a 2 días en un medio de proliferación tal como Megacell, seguido de 9 días en medio de diferenciación (como DMEM bajo en suero enriquecido con TGFbeta). El cultivo dinámico se puede detener después de un tiempo apropiado que generalmente es entre 6 y 14 días, por ejemplo 9 días, con al menos un cambio de medio completo durante ese tiempo. Sin embargo, el cultivo puede ser más largo, por ejemplo hasta por 21 ó 28 días.
- 45
- Opcionalmente, se pueden implantar andamios en el epiplón u otro sitio ectópico, por ejemplo de 4 a 6 semanas antes del trasplante ortotópico para mejorar la vascularización.
- 50
- Además, después del cultivo, y antes del uso, se puede desear epitelizar una o más superficies del andamio, por ejemplo, la superficie que es la superficie luminal en uso. Cuando el andamio o construcción es en sí mismo de forma luminal o tubular, se puede desear epitelizar el lado o la superficie luminal del andamio o construcción (es decir, la superficie interior del andamio o construcción de forma tubular o luminal).
- 55
- El procedimiento de la invención puede comprender así una etapa adicional de sembrar células epiteliales en la construcción. La construcción puede ser sometida a cultivo adicional si fuera necesario.
- 60
- Los comentarios hechos con respecto a la obtención de los mesoangioblastos y fibroblastos se aplican mutatis mutandis para proporcionar las células epiteliales para el suministro y la siembra en la construcción. Por ejemplo, las células primarias derivadas de una biopsia del sujeto para el cual está destinada la construcción, y en particular del órgano luminal (que puede estar dañado o vestigial) de ese sujeto.
- 65
- Después de la siembra epitelial, la construcción se cultivará adicionalmente para permitir el crecimiento o la expansión de la capa epitelial, antes de su uso.

En otro aspecto de la invención, se proporciona una construcción de tejido u órgano (por ejemplo, tejido u órgano luminal) obtenida u obtenible de acuerdo con los procedimientos de la invención. Particularmente, la construcción de tejido u órgano es adecuada para implantación y anastomosis en su sitio previsto.

5 En una realización preferida, la invención proporciona una construcción esofágica o intestinal obtenida u obtenible mediante los procedimientos de la invención. En un aspecto particular, una construcción esofágica puede ser adecuada para la implantación en un neonato o un bebé. Ta y como se explicó anteriormente, se apreciará que las dimensiones del constructo dependerán del sujeto que recibe la construcción y la lesión o daño del órgano que se haya experimentado.

10 Además, se apreciará que la construcción comprenderá el andamio, los fibroblastos y los mesoangioblastos diferenciados y no diferenciados. Particularmente, en la construcción, se prefiere que haya ocurrido la diferenciación de los mesoangioblastos introducidos / sembrados. Por lo tanto, en una realización particular, todos los mesoangioblastos sembrados se habrán diferenciado en células musculares. Sin embargo, es posible que algunos de los mesoangioblastos sembrados no se hayan diferenciado o no se hayan diferenciado completamente en la construcción. En particular, al menos 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 ó 99% de los mesoangioblastos se pueden haber diferenciado o comenzado a diferenciarse en células musculares (células de músculo liso) en las construcciones. La diferenciación de mesoangioblastos en células musculares se puede evaluar fácilmente mediante la medición del marcador SM22 u otros descritos en este documento.

15 En una realización adicional, se proporciona una construcción de tejido u órgano luminal que comprende un andamio, células de músculo liso, fibroblastos y opcionalmente que comprende mesoangioblastos, en donde preferiblemente las células de músculo liso y/o mesoangioblastos están presentes en una proporción de 50:50 a 99:1 en comparación con los fibroblastos, más particularmente en una proporción o al menos 70:30 u 85:15.

20 En otro aspecto, la invención proporcionan procedimientos para tratar a un sujeto que necesita reemplazo o reparación de un tejido u órgano, o que sufre daño y/o pérdida de tejido u órgano, usando una construcción de tejido u órgano de la invención, preferiblemente uno que incorpore células autólogas de ese individuo.

25 El término "sujeto" o "paciente" tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier mamífero, por ejemplo un animal doméstico como un perro, gato, etc., un animal agrícola, como un caballo, cerdo o vaca, etc., o un ser humano. Particularmente, el sujeto o paciente puede ser un recién nacido o un bebé, particularmente un recién nacido humano o un bebé, por ejemplo, que padece atresia esofágica, por lo que la construcción una construcción esofágica.

30 La referencia al reemplazo de un tejido u órgano se refiere al reemplazo de una parte o la totalidad de un tejido u órgano luminal, como los descritos anteriormente. Por lo tanto, el reemplazo de órganos puede referirse al reemplazo de, por ejemplo, al menos 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 ó 100% de un órgano o tejido. Puede ser necesario el reemplazo de un órgano o tejido cuando falta el órgano o parte del mismo, está enfermo o dañado y/o cuando el órgano o parte del mismo no es funcional o tiene una función reducida.

35 Se pueden producir daños en los tejidos o en los órganos debidos a una enfermedad, por ejemplo cáncer o exposición a un agente dañino, como un químico o calor, por ejemplo una quemadura. Por lo tanto, una parte o la totalidad del tejido u órgano se pueden dañar. Además, la "pérdida de tejido u órgano" puede ser el resultado del o daño o puede estar presente, por ejemplo, antes del nacimiento (por ejemplo, un defecto congénito o una afección congénita). La pérdida de un tejido u órgano puede ser una pérdida parcial o completa del órgano o tejido.

40 Tal y como se discutió anteriormente, una construcción de la invención se puede usar para tratar a un sujeto que necesita reemplazo de esófago o que sufre daño o pérdida esofágica. Tal procedimiento utiliza preferiblemente una construcción adecuada para la implantación en el esófago, por ejemplo uno que utiliza un andamio o matriz descellularizada derivada del esófago.

45 En una realización preferida, la invención proporciona un procedimiento para tratar a un sujeto que padece atresia o agenesia esofágica con una construcción de tejido u órgano luminal de la invención (por ejemplo, una construcción esofágica).

50 El término "atresia esofágica" se refiere a una afección en la que el esófago termina en una bolsa ciega que no está conectada al estómago y la "agenesia esofágica", tal y como se usa en este documento, se refiere a un caso particularmente grave de atresia esofágica donde el esófago está completamente ausente.

55 En una realización preferida adicional de la invención, se proporciona un procedimiento para tratar el daño o la pérdida intestinal o para tratar a un sujeto que necesita reemplazo intestinal, preferiblemente, mediante la administración de una construcción luminal de la invención (por ejemplo, una construcción intestinal,

producida usando un andamio intestinal descelularizado).

5 En ciertas realizaciones, los procedimientos comprenden proporcionar una construcción de tejido u órgano luminal implantable de la invención (por ejemplo, de acuerdo con los procedimientos de la invención) e implantar la construcción o tejido en el cuerpo del individuo de acuerdo con procedimientos quirúrgicos estándar - por ejemplo, implantación o trasplante ortotópico.

10 Después de la implantación, las células del individuo pueden migrar al tejido *in vivo*, complementando la población celular sembrada. La migración de las células a la construcción se puede potenciar, por ejemplo, tratando la construcción con factores de crecimiento, agentes quimiotácticos u otros compuestos antes o después de la implantación.

15 Así, un procedimiento de tratamiento de acuerdo con la invención puede comprender la etapa de implantar quirúrgicamente en un paciente una construcción de la invención.

20 Visto alternativamente, la invención proporciona una construcción de la invención para usar en el tratamiento de daño o pérdida de tejido u órgano o para reemplazo de tejido u órgano. En particular, la invención proporciona una construcción para su uso en el tratamiento de atresia esofágica o agenesia esofágica.

Además, la invención proporciona el uso de una construcción de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de daño o pérdida de tejido u órgano o para el reemplazo de un tejido u órgano en un sujeto.

25 También se proporciona el uso en cirugía de una construcción según la invención.

También se proporciona una construcción según la invención para uso en cirugía.

30 También se proporciona una construcción de acuerdo con la invención en la fabricación de un producto para uso en cirugía.

35 En otro aspecto, se proporciona un uso de fibroblastos para mejorar el injerto celular y la colonización (incluyendo migración y / u homogeneidad mejoradas) por mesoangioblastos de un andamio o matriz 3D como se describe en el presente documento (por ejemplo, tubular, para usar con un órgano luminal) y en particular para minimizar la fibrosis. Preferiblemente, los fibroblastos se usan en una proporción de mesoangioblastos: fibroblastos dentro de los siguientes intervalos de proporciones 50:50 a 99: 1; 65:35 a 90:10; 70:30 a 90:10; 80:20 a 90:10; 83:17 a 88:12. Una relación preferida es aproximadamente 85:15.

40 Una "mejora" del injerto celular y la colonización puede incluir, por ejemplo, un aumento en el número de células sembradas que se adhieren a la matriz (por ejemplo, un aumento de al menos 10, 20, 30 o 40%) y / o como se discutió anteriormente, un mejora en la migración de mesoangioblastos a través del andamio, en comparación con andamios sembrados sin fibroblastos o con una proporción subóptima de mesoangioblastos: fibroblastos.

45 La "migración mejorada" puede incluir un aumento en la velocidad a la que los mesoangioblastos pueblan el andamio (por ejemplo, una reducción en el tiempo necesario para poblar el andamio), un aumento en el número de mesoangioblastos que migran a través del andamio y / o un aumento en la distancia sobre el cual migran los mesoangioblastos. Cualquiera o más de la tasa de migración, el número de células que migran o la distancia migrada pueden aumentar en al menos 10, 20, 30 o 40% en comparación con los mesoangioblastos sembrados en un andamio correspondiente (es decir, el mismo o sustancialmente el mismo andamio) en ausencia de fibroblastos.

50 Cualquier subtítulo en este documento se incluye solo por conveniencia, y no se debe interpretar como que limita la divulgación de ninguna manera.

55 La invención ahora se describirá a continuación haciendo referencia adicionalmente a las siguientes figuras y ejemplos no limitantes. A la luz de estos, a los expertos en la materia se les ocurrirán otras realizaciones de la invención.

60 Dibujos

65 Figura 1: Colocación del tubo NG y microinyección de fMABS en la pared muscular de la matriz esofágica en condiciones estériles.

Figura 2: Andamios microinyectados y sembrados en superficie, abiertos longitudinalmente y colocados en 24 placas de pocillos múltiples para cultivo estático.

Figura 3: Cámaras de cultivo utilizadas en el cultivo de construcciones.

Figura 4: Biorreactor y cámara de cultivo.

5

Figura 5: Implantación omental de andamios esofágicos sembrados en ratones inmunocomprometidos.

10

Figura 6: Son fMABS cultivados en medios proliferantes expresados en marcadores AP y NG2. Cuando se cultivaron en medio de diferenciación del músculo esquelético, se fusionaron formando miotubos positivos para MF20 que contenían núcleos positivos para MyoD. Los fMABS también mostraron marcadores de diferenciación de músculo liso cuando se cultivaron con medio específico que expresa SM22 y aSMA en cultivo.

15

Figura 7: Conteo de células (gráficos) de imágenes DAPI de andamio esofágico de rata sembrado con células administradas con Matrigel o medio a través de microinyecciones o siembra en superficie.

20

Figura 8: Experimento de siembra conjunta de fMABS sembrado junto con FB de ratón o solo. Imágenes representativas con tinte DAPI.

25

Figura 9: Cámara de cultivo configurada en el cultivo estático inicial dentro de las primeras 24h. Tinte DAPI de criosecciones del andamio cultivado dinámico sembrado con fMABS.

30

Figura 10: (A) H&E e inmunofluorescencia de núcleos humanos en secciones de andamios sembrados implantados en el epiplón de ratones desnudos durante 2 y 4 semanas. (B) Número de celda por área contada en imágenes aleatorias de secciones teñidas con DAPI. (C) Coloración conjunta [teñido o tinción conjunta] de núcleos humanos y marcador Ki67. (D) Porcentaje de células positivas para núcleos humanos, doble positivo para núcleos humanos y Ki67 (células de ratón) o solo Ki67 (células de ratón). Estas 3 categorías se muestran de arriba a abajo en la barra de la izquierda. Tal y como se explica a continuación, después de 1 mes, están presentes principalmente células nucleares humanas.

35

Figura 11: Tinción DAPI de criosecciones obtenidas del andamio cultivado que muestra el injerto celular y la proliferación dentro de la matriz (figura 11A, B), distribución celular y migración estimulada y mejorada por la condición de cultivo dinámico (H&E, figura 11C, D). La diferenciación del músculo esquelético se determinó con tinción MyoD, un marcador específico para las células precursoras del músculo esquelético (figura 11E, F)

40

Figura 12: Efecto positivo de los FB sobre el injerto de MAB humanos en el ECM. La siembra de hMAB y mFB en una proporción de 85:15 mostró el mantenimiento de la proporción celular después de 5 días en cultivo, mientras que la proporción de 70:30 condujo a una mayor proliferación de fibroblastos durante el cultivo con una proporción resultante de 50:50 después de 5 días. La proporción celular se determinó con tinción de núcleos humanos; las hMABs expresaron el marcador del músculo esquelético SM22 subyacente al compromiso de diferenciación muscular.

45

Figura 13: Optimización de las condiciones de cultivo y siembra de células in vitro para mesoangioblastos y fibroblastos cultivados en andamios de ratas descelularizadas mediante diferentes proporciones y condiciones de cultivo (días en medio de proliferación + días en medio de diferenciación).

50

Figura 14: Optimización de las condiciones de cultivo y siembra de células in vitro para mesoangioblastos y fibroblastos cultivados en andamios de ratas descelularizadas. Una mezcla 85:15 se compara con hMABS solo y la capa muscular de un esófago fresco de rata.

55

Figuras 15 y 16: Experimentos de siembra de células in vitro en andamio esofágico de conejo descelularizado. La distribución celular y la migración se compararon en cultivo dinámico frente a cultivo estático de hMABS solo y células de músculo liso (origen de perro)

60

Figura 17: Optimización del trasplante ortotópico de andamio acelular no sembrado de animales donantes de ratas y conejos en modelos de ratas y conejos, respectivamente. El esófago original se expuso reflejando lóbulos y músculos de la tiroides y se extrajo un segmento de esófago (entre 1 y 2,5 cm, según el modelo animal) (figura 17A). Luego se realizaron anastomosis distales y proximales (figura 17B) para conectar ambos extremos del andamio al esófago existente (rata, figura 17C; conejo, figura 17D, E).

65

Figura 18: Ensayo de viabilidad celular MTT. A) Imágenes de andamios esofágicos de rata

sembrados con diferentes densidades de hMABs. El número de células se detectó indirectamente midiendo la producción de formazan púrpura después de 24h; B) Cuantificación de la viabilidad celular a través de la lectura de absorbancia de formazán extraído del andamio sembrado.

5 Figura 19: A) imágenes representativas de andamios hMAB o sembrados conjuntamente después de 9 días de cultivo dinámico; 85:15 muestra con tinción teñida también para núcleos; B) número de celda representativo por campo en cada capa contado en imágenes aleatorias de secciones teñidas (\*\* p <0.01 y \*\*\* p <0.001); C) distribución de células entre capas expresada como porcentaje con respecto al número total de células injertadas en cada condición; D) relación entre el área de las capas de andamio sembradas con respecto al control no sembrado (expresado en 0); E) densidad celular representativa por capa calculada a partir del número de células y el área cubierta por la última en imágenes aleatorias (M: músculo; S: submucosa).

10  
15 Figura 20: A) imágenes representativas de KI67+ células. Células humanas (85:15) marcadas también para hnúcleos; B) porcentajes de KI67+ células después de 9 días de cultivo dinámico con respecto al número total de células contadas en cada capa de imágenes aleatorias (\*\* p <0.01); C) distribución de KI67+ células entre capas, expresadas como porcentaje, y contribución de mFBs (M: músculo).

20 Figura 21: A) imágenes representativas de SM22+ células. Células humanas (85:15) marcadas también para hnúcleos; B) porcentajes de SM22+ celdas con respecto al número total de celdas contadas en cada capa de imágenes aleatorias (\*\* p <0.01); C) distribución de SM22+ células entre capas, expresadas como porcentaje, y contribución de mFBs (M: músculo; S: submucosa).

25 Figura 22: comparación de la densidad celular lograda usando cultivo conjunto versus MAB solo: los resultados demuestran la superioridad del cultivo conjunto.

30 Figura 23: Los fibroblastos de ratón (mFB) aislados de los músculos esqueléticos de las extremidades posteriores del ratón presentaron una morfología característica después de la expansión in vitro (tinción de Ki67 para la proliferación) y fueron positivos para marcadores típicos como Vimentin y TCF-4 (barra: 100 µm).

35 Figura 24: A) Distribuciones esquemáticas representativas de todas las células dentro del andamio después de 6 días de cultivo estático. B) Distribución polar de los mismos mapas de distribución esquemática asumiendo una sección perfectamente circular. C) Número total de células por área en andamios hMAB solo o de siembra conjunta contados en secciones aleatorias teñidas para DAPI y Núcleos humanos n≥3.

40 Figura 25: A) Representación esquemática del estudio del efecto sobre la migración de hMAB cuando se siembra con / sin mFB. Se sembraron Luciferasa+ hMAB con / sin mFB de tipo salvaje en el centro del andamio tubular y se midió la bioluminiscencia con IVIS cada 24 h durante 5 días de cultivo estático. B) Imágenes representativas de bioluminiscencia que muestran células Luciferasa + (Luc+) en los andamios después de 1, 3 y 5 días de cultivo. Imágenes donde se analizaron calculando la radiancia [flujo radiante] en 8 regiones de interés (ROI por sus siglas en inglés de "regions of interests") posicionadas desde el centro del punto de inyección (C). Radiancia medida en las ROI 3 a 6 después de 1, 3 y 5 días de cultivo.

45  
50 Figura 26: A) Imágenes representativas de andamios sembrados con  $8,5 \times 10^5$  hMAB o  $1 \times 10^6$  hMAB con/sin mFB completamente abierto y teñido con MTT después de 6 días de cultivo estático. Se analizó la migración celular desde los puntos de inyección midiendo la intensidad del color (valor gris) a lo largo de 8 líneas aleatorias dibujadas radialmente desde el centro de los grupos de células hasta el borde del andamio (segmento A-B). B) Gráfico representativo del valor de Gray obtenido al medir la línea A-B con la distancia en píxeles calculada entre las dos mesetas. C) Distancia recorrida por las células migradas desde el punto de inyección en mm.

55  
60 Figura 27: A) Distribuciones esquemáticas representativas de todas las células dentro del andamio después del cultivo estático o dinámico. B) Distribución polar de los mismos mapas de distribución esquemática asumiendo una sección perfectamente circular. C) Número total de células por área en andamios cultivados en condiciones estáticas o dinámicas contadas en secciones aleatorias teñidas para DAPI y núcleos humanos (n≥3). D) Proporción de hMAB y mFB en andamios cultivados en condiciones dinámicas determinadas a partir del conteo celular en secciones aleatorias teñidas para DAPI y núcleos humanos (n≥3).

65 Figura 28: A) Imágenes de bioluminiscencia de un andamio de siembra conjunta con Luc+hMAB y mFB y cultivadas en el biorreactor durante 7 días, mostrando la migración / distribución de las células desde los puntos de inyección. B) Valores de radiancia calculados a partir de las imágenes recopiladas en los diferentes puntos de tiempo.

Figura 29: A) Distribuciones esquemáticas representativas de todas las células dentro del andamio (negro) después del cultivo estático o dinámico. Las células se tiñeron para núcleos humanos y SM22; la figura también muestra células hNúcleos+SM22+ y células DAPI+ (hNúcleos-SM22-). B) Porcentaje de células SM22+ después del cultivo estático o dinámico contadas en imágenes aleatorias de diferentes secciones (n≥3) y la contribución de hMAB y mFB al porcentaje total (\*\* p <0,01). C) Imágenes representativas de tinción para núcleos humanos y SM22 (bar:100 μm). D) Porcentaje de células Ki67+ proliferativas después del cultivo estático o dinámico contadas en imágenes aleatorias de diferentes secciones (n≥3) (\*\* p <0,01).

Figura 30: Coloración conjunta para αSMA o calponina con SM22 en andamios sembrados conjuntamente con hMAB y mFB cultivados en el biorreactor para evaluar el nivel de maduración de las células del músculo liso.

## **Ejemplos**

### *Aislamiento y evaluación de mesoangioblastos.*

Los mesoangioblastos fetales (fMABS) se aislaron del tejido muscular de fetos humanos a las 9 a 12 semanas de gestación. Las muestras se colocaron en placas recubiertas con Matrigel diluido y se dejaron en cultivo durante 8 días. Las células migradas de los tejidos musculares fueron recolectadas y expandidas en cultivo para evaluación. Las células se evaluaron en los pases 4, 5, 6 y 7 de cultivo con inmunofluorescencia, FACS y potencial de diferenciación hacia el músculo liso y esquelético. Para el análisis FACS, las células se incubaron con anticuerpos contra CD31, CD34, CD44, CD45, CD56, CD90 y CD146. Para el potencial de diferenciación, las células se incubaron con medio sérico bajo (diferenciación del músculo esquelético) y con la adición de TGFβ (para la diferenciación del músculo liso).

### *Establecimiento de líneas celulares musculares.*

Se obtuvieron seis biopsias musculares de donantes (1 paciente adulto; 5 pacientes pediátricos) con el consentimiento del paciente antes de la obtención. De las seis biopsias, se establecieron con éxito tres líneas celulares primarias de mesoangioblastos y se llevaron al pasaje [pase o subcultivo] 7 antes de la diferenciación en el músculo esquelético y liso. Las líneas celulares de mesoangioblastos se criopreservaron en cada pasaje celular para establecer un banco para futuros estudios de evaluación y recultivo.

Las líneas celulares de mesoangioblastos se establecieron en matraces T25 recubiertos con colágeno (derivados de la placenta) para permitir la comparación directa con los procedimientos que utilizan placas perti recubiertas con matrigel. Se estableció un panel de citometría de flujo de ocho colores utilizando el citómetro de flujo MACSQuant para la caracterización [evaluación] fenotípica de líneas celulares mesoangioblast en cada pasaje. Todos los anticuerpos fueron titulados y el panel validado para la evaluación de mesoangioblastos.

Posteriormente, se obtuvieron otras dos biopsias musculares de adultos después del consentimiento informado.

Las líneas celulares primarias de mesoangioblastos se establecieron con éxito en matraces de cultivo recubiertos con colágeno, utilizando un procedimiento transferido del profesor Giulio Cossu en UCL. En total, se crioconservaron cinco líneas celulares desde el pasaje 0 hasta el pasaje 7.

Se establecieron experimentos preliminares para determinar la función celular y el fenotipo de las líneas celulares de mesoangioblastos descongeladas para replicar el futuro proceso de fabricación clínica. Dos líneas celulares en el paso 3 se descongelaron con éxito y se volvieron a cultivar sin ningún efecto adverso sobre la función celular, la división y expansión celular y el fenotipo.

La evaluación de la diferenciación esquelética y del músculo liso se investigó en dos líneas celulares de mesoangioblastos mediante tinción intracelular tanto para la actina del músculo liso α como para la cadena pesada de miosina mediante citometría de flujo. Ambos anticuerpos ahora han sido optimizados y validados. Derivación de cultivos primarios de fibroblastos a partir de biopsias musculares.

El aislamiento y la expansión de fibroblastos derivados de músculo se estableció a partir de las mismas biopsias utilizadas en el aislamiento de mesoangioblastos.

Se obtuvieron reactivos de grado GMP (colagenasa y proteasa neutra) para la digestión de tejidos y se probaron con éxito con una biopsia muscular en adultos. Se estableció una línea celular de fibroblastos y se expandió al pasaje 4, adoptando procedimientos operativos estándar

5

La derivación de dos líneas celulares de una biopsia permite una siembra conjunta más rápida de andamios para aumentar la unión de las células mesoangioblásticas.

#### 10 *Cultivo de células epiteliales (EC) y fibroblastos*

El cultivo de EC (del inglés "*Epithelial cell*") y fibroblastos (usando fibroblastos MRC5) se realizó con EC cultivadas en capas alimentadoras de fibroblastos irradiados.

15

Los datos (no se muestran) demuestran que el epitelio esofágico de rata se puede sembrar efectivamente en el esófago descelularizado.

#### 20 *Descelularización del esófago de rata.*

Los esófagos de rata se descelularizaron con un tratamiento detergente enzimático (DET del inglés "*detergent-enzymatic treatment*") que consistía en perfusión luminal con suministro continuo de líquido de agua desionizada a 4 °C durante 24 h, 4% de desoxicolato de sodio a temperatura ambiente (RT del inglés "*room temperature*") durante 4 h, y 50 kU/mL de DNasa-I en NaCl 1 M a temperatura ambiente durante 3 h. Los andamios acelulares se almacenaron durante hasta 1 mes en PBS con 1% de P/S a 4 °C.

25

#### 30 *Siembra celular*

Para la siembra de células en el andamio acelular, tanto fMABS como fibroblastos de ratón (solo para experimentos de siembra conjunta) se tripsinizaron entre los pasajes 5 y 7 y se suspendieron en medio de factor de crecimiento Matrigel reducido (GFR) diluido 1:2 o solo un medio y se mantuvieron en hielo. Los andamios se canularon con un tubo NG para permitir un acceso y manejo más fácil para la siembra.

35

Se inyectaron células usando una jeringa de insulina y realizando múltiples inyecciones de aproximadamente 5 µl cada una para cubrir tantas áreas del andamio esofágico como sea posible. Las células se inyectaron a una densidad de 10<sup>6</sup> células / 5 mm de longitud directamente en la capa muscular de la matriz, utilizando un microscopio estereoscópico colocado en una capucha estéril (figura 1). Alternativamente, las células suspendidas en Matrigel GFR diluido 1:2 o en un medio se sembraron en la superficie del andamio.

40

Dependiendo de la condición de siembra probada y de los resultados, los andamios sembrados opcionalmente fueron:

45

- cultivados como matrices tubulares en condición estática en placas de pocillos múltiples con medios de proliferación o diferenciación,

50

- abiertos longitudinalmente, cultivados como matrices planas en condición estática en placas de pocillos múltiples con medios de proliferación o diferenciación (figura 2),

55

- suturados en cenadores de plástico o vidrio como matrices tubulares y colocados en biorreactor durante 24 h de cultivo estático y subsiguientes 6 a 7 días de cultivo dinámico.

Los esófagos concebidos mediante ingeniería de cultivos en condiciones estáticas o dinámicas se fijaron con formalina a los 6-7 días de cultivo y se procesaron para análisis histológicos e inmunofluorescentes.

60

#### *Biorreactor*

El cultivo dinámico se realizó típicamente usando un biorreactor suministrado por Applikon® Biotechnology, adaptado adecuadamente. El biorreactor constaba de dos componentes: un depósito autoclavable equipado con sensores y agitador; un controlador que monitorea el pH, la temperatura, la velocidad del agitador, el nivel de espuma y las bombas de tubería de soporte. Además, se instaló una PC como interfaz.

65

5 Se colocaron andamios esofágicos cultivados dentro de cámaras personalizadas hechas de vidrio (aunque se podrían usar otros materiales de manera similar) lo que permitió tanto la esterilización como el monitoreo visual de la muestra en su interior. Cada borde del andamio se suturó a una varilla de vidrio en un plato estéril dentro de una campana de cultivo de tejidos. A continuación, las barras y el andamio se arrastraron suavemente a través de la cámara de vidrio hasta que ambas barras sobresalían de cada extremo.

10 Las tapas, junto con las arandelas y las juntas tóricas, se conectaron y se cerraron. En el otro extremo, los tubos equipados con cierres luer [luer-locks] unían los extremos abiertos de la varilla al depósito para garantizar una circulación media. Finalmente, se colocaron cámaras de alojamiento de andamios dentro de una incubadora estándar.

15 Para establecer un flujo pulsátil, se utilizó una bomba dedicada (iPump).

20 En uso, las matrices esofágicas sembradas con fMABS se montaron en las cámaras de cultivo autoclavables (véase, por ejemplo, la figura 3) y se dejaron en cultivo estático durante 24 h en un medio de proliferación. Luego, el medio se retiró de la cámara (compartimientos externo e interno), se cambió con un medio de diferenciación y la cámara se conectó al biorreactor Applikon con tubos y conectores estériles para comenzar el cultivo dinámico (figura 4). El biorreactor permitió el control de la temperatura del yacimiento, la presión de O<sub>2</sub> y de CO<sub>2</sub> en el medio, y la tasa de flujo, en el compartimento externo / interno del medio de reciclaje.

#### 25 *Trasplante de esófagos concebidos mediante ingeniería en el epiplón*

30 Después de la siembra celular, bajo anestesia, se implantaron andamios tubulares de 5 mm en la cavidad abdominal de ratones desnudos y se envolvieron con el epiplón utilizando suturas absorbibles. Se implantaron andamios con el tubo NG en el lumen para evitar el colapso de la matriz y mantener la arquitectura esofágica (figura 5). Los animales se sacrificaron a las 2 y 4 semanas después de la implantación y los andamios cosechados y fijados para histología.

#### 35 *Análisis histológico e inmunofluorescente.*

40 Las muestras de tejido y los cultivos celulares se fijaron en solución de formalina tamponada neutra al 10% en PBS a 4 °C durante 24 h (tejidos) o 10 min (células) y luego se lavaron en agua destilada (dH<sub>2</sub>O). Los tejidos se deshidrataron en solución de sacarosa y se congelaron en nitrógeno líquido para la criosección. Las secciones de 7 µm y las células fijadas en placas se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) o se inmunotizaron para fosfatasa alcalina (AP del inglés "Alkaline Phosphatase"), NG2, PDGFRbeta, cadena pesada de miosina (MyHC), miogenina, alfa liso actina muscular (αSMA del inglés "alpha Smooth Muscle Actin"), SM22, núcleos humanos, Ki67, CD68 y MyoD. Las muestras se incubaron con anticuerpos secundarios fluorescentes, se contratiñeron con DAPI y se montaron en medios de montaje acuosos.

#### Ejemplo 1- Evaluación fetal de MABS

50 Los MABS fetales mostraron una morfología, características y expresión de marcadores comparables con los MABS adultos. Los análisis FACS detectaron niveles bajos de CD31, CD34, CD45, CD90 (0-1%), niveles altos de CD44 (97-100%) y niveles variables de CD56 y CD146 (de 0 a 25%). En cultivo con medio de proliferación, los fMABS fueron positivos para la reacción AP y la tinción de NG2, dos marcadores clásicos de MABS (figura 6). Cuando se incubaron con medios de diferenciación del músculo esquelético, las células pudieron fusionarse y formar miotubos maduros positivos para MF20 y expresar el marcador nuclear miogenina (MyoG). El fMABS también demostró capacidad de diferenciación hacia el fenotipo del músculo liso cuando se cultivó con medio agregado bajo en suero enriquecido con citocina TGFβ. Después de 6 días en el músculo liso, las células de diferenciación expresaron marcadores lisos típicos como SM22 y αSMA.

#### Ejemplo 2 - Optimización de la siembra celular en la ECM esofágica acelular

65 La siembra de matriz acelular esofágica se realizó comparando el suministro de células en Matrigel o medio para comprender el efecto del vehículo sobre la supervivencia celular y el injerto. Además, se evaluó la

comparación de la microinyección versus la siembra superficial analizando la adhesión celular y la migración al andamio después de 24 y 48 horas de cultivo estático. Los MABS fetales administrados en Matrigel a través de microinyecciones y siembra en superficie en andamios esofágicos acelulares de rata mostraron adhesión y supervivencia celular después de 24 y 48 h. La adhesión celular sobre la superficie de la matriz fue más eficiente que el injerto celular dentro de la matriz en muestras microinyectadas; sin embargo, el número de células aumentó con el tiempo en el caso de matrices microinyectadas que resaltan una mayor proliferación celular (figura 7). Las células sembradas solo con medio mostraron menor injerto y proliferación, sin cambios sustanciales entre 24 y 48 h de cultivo estático. Estos datos ayudaron a mejorar la comprensión de los efectos de Matrigel vs medio y de la técnica de siembra sobre la supervivencia celular y la proliferación en la matriz acelular.

### *Ejemplo 3 - Siembra conjunta de fMABS y mFBs en el andamio acelular*

Se realizaron experimentos de siembra conjunta para establecer el efecto de fibroblastos (FB) sobre la supervivencia celular y la migración dentro de la matriz cuando se sembraron junto con fMABS. Microinyectamos fMABS combinados con FB de ratón en una proporción de 85:15 y 70:30 o fMABS solo como control, para una densidad celular total de  $1 \times 10^6 / 5 \text{ mm}$  de longitud del andamio. Las muestras fueron cultivadas en condiciones estáticas durante 5 días. Las criosecciones de andamios sembrados teñidos con DAPI mostraron un número considerable de células y una mejor distribución celular en andamios sembrados conjuntamente en comparación con muestras sembradas solo con fMABS, lo que indica un efecto positivo de los FB en el injerto de fMABS en el ECM (figura 8). Además, la mejor proporción de fMABS y mFB parecía ser 85:15, mostrando un evidente mayor número de células dentro de la matriz. Estos datos se completarán con análisis adicionales para identificar fMABS y mFB en las muestras sembradas y su especificación de expresión de marcador después de 6 días en cultivo conjunto. Además, el número exacto de celdas por área se determinará en imágenes aleatorias.

### *Ejemplo 4: Cultivo dinámico con biorreactor*

Paralelamente a los experimentos de siembra conjunta, se realizaron experimentos de cultivo dinámico utilizando un biorreactor y dos cámaras de cultivo diferentes para órganos huecos. Las cámaras se evaluaron por características similares: cámara interna y externa con flujo separado, autoclavable, conectable con depósito medio a través de tubos y conectores estériles de silicio. Sin embargo, los experimentos preliminares destacaron algunos problemas relacionados con la contaminación del andamio, el mantenimiento de un nivel medio constante y sintonizable dentro de la cámara y la sutura del andamio tubular al puerto. Por estas razones, después de los intentos iniciales, se realizaron experimentos de cultivo dinámico utilizando una cámara de vidrio hecha a medida descrita anteriormente.

Los MABS fetales se microinyectaron en el andamio acelular esofágico y luego se suturó la construcción a los dos insertos de vidrio que permiten separar el compartimento interno y externo de la cámara. La cámara de cultivo se ensambló, se conectó al biorreactor y al depósito y finalmente se llenó con medio de proliferación en ambos compartimientos. La cámara se incubó 6 h en estado estático antes de comenzar el flujo del medio en la cámara interior para el cultivo dinámico (figura 9). Después de 24 h de cultivo, se cambió el medio de proliferación a medio de diferenciación tanto en la cámara como en el depósito. El cultivo dinámico se detuvo después de 6 días con un cambio de completo del medio a los 3 días de cultivo. A partir del análisis preliminar de las criosecciones obtenidas del andamio sembrado en cultivo dinámico, hubo un injerto celular evidente y proliferación dentro de la matriz (figura 9). Las muestras cultivadas dinámicas parecían mejorar la migración celular y una mejor distribución homogénea dentro del andamio, en comparación con las evidencias preliminares. Además, la configuración del biorreactor utilizada en este experimento mejoró el éxito general del cultivo evitando contaminaciones, permitiendo un mejor control de flujo, control de temperatura, oxigenación del medio y manejo de andamios.

### *Ejemplo 5 - Implantación omental de andamio sembrado*

Para estudiar la vascularización y la remodelación del andamio acelular *in vivo*, se implantaron andamios tubulares sembrados con MABS en el epiplón de ratones inmunocomprometidos como una etapa previa a la vascularización antes de futuros trasplantes ortotrópicos.

Después de 2 y 4 semanas desde el trasplante, se identificaron MABS humanos en el andamio con tinción de núcleos humanos (figura 10A). Los análisis de H&E e inmunofluorescencia mostraron migración celular desde el huésped (núcleo negativo), lo que indica una activación de búsqueda de células por el ECM implantado. La histología también destacó la modesta remodelación de la matriz después de dos semanas

del trasplante con capas de ECM esofágicas que aún eran reconocibles. Por otro lado, la remodelación de la matriz fue más evidente 1 mes después del trasplante con pérdida de estructuras originales. Las células humanas fueron menos después de 1 mes cuando se contaron con respecto al área analizada (cm<sup>2</sup>) (figura 10B). Cuando se analizó con un marcador de proliferación (Ki67), aproximadamente el 5% del número total de células proliferaba MABS humano, mientras que el 9% restante fue negativo para este marcador a las dos semanas después del trasplante (figura 10C y D). Después de 1 mes, no se encontraron células proliferantes dentro del andamio. Estos datos preliminares indican que dos semanas parecen ser un buen compromiso para esta etapa *in vivo* para obtener una prevascularización inicial (evidenciada por la presencia de pequeños vasos nuevos en secciones teñidas con H&E) y una remodelación limitada de la matriz que preserva la organización original de ECM.

Las muestras se evaluaron por la presencia de macrófagos (células CD68+), células del músculo liso (células αSMA+) y MyoD (células precursoras del músculo esquelético). Los MABS humanos fueron negativos para los marcadores de músculo liso y esquelético, lo que indica la pérdida de la función de estas células que dejaron de proliferar y de diferenciarse después de unos días después del trasplante. Es necesario realizar análisis adicionales y experimentos adicionales para comprender el comportamiento celular y mejorar su injerto y activación. Se encontraron macrófagos dentro del andamio distribuidos de manera homogénea en ambos puntos temporales, lo que respalda el proceso de remodelación en curso en el andamio por las células huésped.

#### *Ejemplo 6 - Análisis de experimentos previos de siembra de células con andamios de ratas descelularizadas*

Se inyectaron mesoangioblastos (MAB) en el andamio acelular esofágico de rata y se cultivaron durante 24 h en medio de proliferación seguido de 5 días de medio de diferenciación (hacia el músculo esquelético). Del análisis preliminar (tinción DAPI) de las criosecciones obtenidas del andamio cultivado hubo un injerto celular evidente y proliferación dentro de la matriz (figura 11A, B). Los análisis más profundos resaltaron la distribución celular y la migración estimulada y mejorada por la condición de cultivo dinámico (H&E, figura 11C, D). Las células también mostraron un compromiso inicial hacia la diferenciación del músculo esquelético según lo determinado con la tinción MyoD, un marcador específico para las células precursoras del músculo esquelético (figura 11E, F).

Como se señaló anteriormente (Figura 8), cuando los MAB se inyectaron conjuntamente con fibroblastos de ratón (mFB) en una proporción de 85:15 y 70:30 y se cultivaron durante 5 días en condiciones estáticas, se injertó un número considerable de células y hubo una mejora en la distribución de células en comparación con las muestras sembradas sólo de MABS, lo que indica un efecto positivo de los FB en el injerto de MAB en humanos en la MEC (figura 12). Los análisis posteriores revelaron que la siembra de hMAB y mFB en una proporción de 85:15 mostró el mantenimiento de la proporción celular después de 5 días en cultivo (figura 12), mientras que la proporción de 70:30 condujo a una mayor proliferación de fibroblastos durante el cultivo con una resultante 50: Relación 50 después de 5 días. La proporción celular se determinó con tinción de núcleos humanos (figura 12). Además, los hMABs expresaron el marcador del músculo esquelético SM22 subyacente al compromiso de diferenciación muscular.

#### *Ejemplo 7 - Optimización de las condiciones de cultivo y siembra de células in vitro para mesoangioblastos y fibroblastos cultivados en andamios de ratas descelularizadas.*

La mejor condición de siembra conjunta de hMAB: mFB (85:15) se utilizó para optimizar la condición de cultivo en comparación con hMAB solo. Los andamios de rata inyectados con una siembra conjunta de 85:15 o solo hMAB se cultivaron durante 2 ó 4 días en medios de proliferación seguidos de 7 días (2+7 y 4+7 días respectivamente) en medios de diferenciación que contenían TGFβ para inducir la diferenciación del músculo liso. Los andamios se cultivaron en entornos estáticos y dinámicos. No se destacaron diferencias claras de la tinción DAPI de muestras de cultivo estático entre condiciones de cultivo de 2+7 y 4+7 (figura 13).

En comparación con los hMAB solos, las condiciones 2+7 y 4+7 para la siembra 85:15 mostraron un mejor injerto, mejor distribución y orientación celular dentro del andamio (figura 13). El cultivo dinámico de andamios sembrados conjuntamente o solo con hMAB para 2+7 evidenció un notable injerto celular y proliferación con respecto a condiciones estáticas (figura 14). El número de células detectadas después de 2+7 días de cultivo fue más similar a la capa muscular de un esófago de rata fresco en comparación con todos los experimentos anteriores de cultivo estático (EM: *muscularis externa*, figura 14).

#### *Ejemplo 8 - Experimentos in vitro de siembra celular en andamio esofágico de conejo descelularizado.*

5 Las hMAB solas se sembraron en un andamio esofágico de conejo descelularizado y se cultivaron en cultivo estático y dinámico durante 7 días. Se utilizaron células de músculo liso (originadas de perro) como control en experimentos paralelos (figura 15). La siembra del andamio de conejo confirmó una mejor distribución y migración celular al comparar el cultivo dinámico con el estático, a pesar de sembrar hMAB solo. Las muestras sembradas con SMC mostraron un alto nivel de injerto celular y supervivencia, pero menor migración celular desde el sitio de inyección (figura 16). Los hMAB mostraron una distribución homogénea en todas las capas del andamio y orientación a lo largo de las fibras musculares preexistentes (H&E, figura 16).

15 *Ejemplo 9 - Optimización del trasplante ortotópico de andamio acelular sin sembrar de animales donantes de ratas y conejos en modelos de ratas y conejos, respectivamente.*

20 El procedimiento para el trasplante ortotópico de andamios esofágicos acelulares se optimizó aún más. Se implantaron segmentos de matrices descelularizadas sin células previas que sembraron en ratas y conejos para definir las etapas y las condiciones para futuros trasplantes de construcciones creadas mediante ingeniería *in vivo*. El procedimiento se desarrolló para el modelo animal de rata y conejo. Esto consiste en exponer el esófago original que refleja los lóbulos y músculos de la tiroides, extirpar un segmento de esófago (entre 1 y 2,5 cm, según el modelo animal) y pasar un tubo NG para ayudar a estabilizar e identificar el esófago durante las anastomosis (figura 17A). Luego se realizaron anastomosis distales y proximales (figura 17B) para conectar ambos extremos del andamio al esófago existente (rata, figura 17C; conejo, figura 17D, E). Estos experimentos destacaron que las construcciones de la invención eran capaces de (i) sutura efectiva sin fugas inmediatas, (ii) buenas propiedades de tensión / estrés, para la ingesta de alimentos, (iii) excelente biocompatibilidad.

30 *Ejemplo 10 - Optimización de la densidad de siembra celular*

35 Para establecer la cantidad de células necesarias para obtener un injerto exitoso, se probaron diferentes densidades de mesoangioblastos humanos (hMAB) utilizando el ensayo de viabilidad MTT y la obtención de imágenes, lo que permitió la visualización de las células injertadas y su cuantificación indirecta. Las células viables metabolizan el sustrato proporcionado (MTT) y produjeron un producto de cambio de color visible (formazán) que se puede extraer y cuantificar mediante lectura de absorbancia. Los segmentos del andamio se sembraron e incubaron durante 24 horas antes de proceder con el ensayo.

40 Después de una incubación de 4 horas con solución de MTT, las células formazan-positivas fueron visibles dentro del andamio destacando su migración desde el sitio de inyección (figura 18A). El análisis preliminar de las imágenes sugirió que la inyección de  $1 \times 10^6$  célula / 0,5cm condujo al injerto más efectivo. Este resultado se confirmó adicionalmente cuantificando el producto de reacción. Las mediciones de absorbancia confirmaron que la concentración de formazán, que refleja el número de células viables, fue mayor en esta condición en comparación con las otras (figura 18B).

50 *Ejemplo 11 - Investigación de la distribución y diferenciación celular en todos los andamios cultivados con el sistema dinámico.*

55 Para mejorar el injerto celular y la distribución dentro del andamio, se utilizó un enfoque de cultivo dinámico que permite un flujo medio continuo, favoreciendo el intercambio de nutrientes y oxígeno. Como se determinó previamente, se cultivaron esófagos sembrados con hMAbs y cultivo conjunto (hMAB y fibroblastos) de dos días en medios de crecimiento y 7 días en medios de diferenciación de músculo liso. Se proporcionó TGF $\beta$  fresco diariamente a una concentración de 2 ng/mL. Tal y como se muestra en la figura 19A-B, después de un total de 9 días de cultivo, la capa muscular del andamio sembrado con hMAB albergaba un número significativamente mayor de células en comparación con la contraparte sembrada conjuntamente. La submucosa mostró la tendencia opuesta, estando significativamente más poblada en el andamio sembrado conjuntamente que en el hMAB solo.

65 Además, utilizando el proceso de siembra conjunta, las células se distribuyeron de manera más homogénea en andamios con sembrados conjuntamente con respecto a las muestras sembradas con hMAB, confirmando experimentos previos realizados en estática (figura 19C). Curiosamente, al final del período de cultivo, las dimensiones de todas las capas esofágicas resultaron expandirse en ambas condiciones en comparación con las matrices sin sembrar (figura 19D). En particular, la capa muscular del andamio sembrado con hMAB resultó ser más ancha que la contraparte sembrada conjuntamente. Este aumento en

el grosor, junto con un mayor número de hMABs injertados, produjo una densidad celular resultante comparable a los andamios sembrados 85:15 (figura 19E).

5 El análisis de proliferación a través de la detección de células KI67 + (figura 20A) mostró que el porcentaje de células proliferantes fue significativamente mayor en el andamio sembrado con hMAB (24%) en comparación con la siembra conjunta (10%). En particular, en el andamio sembrado con hMABs, se detectó el mayor porcentaje de células proliferantes (85%) en la capa muscular, mientras que en el andamio de siembra conjunta las células KI67 + parecían estar distribuidas de manera más uniforme como se destaca por el cálculo de la densidad celular (figura 20C).

10

Con respecto a la diferenciación del músculo liso, el porcentaje de células SM22 + fue mayor en el andamio sembrado solo con hMAB (40%) en comparación con la siembra conjunta (figura 21A-B). Además, como se evidenció previamente en estado estático, la mayoría de las células diferenciadas se distribuyeron en la capa muscular tanto en andamios sembrados con hMAB (85%) como con el sembrado conjunto (70%) (figura 21C).

15

#### *Ejemplo 12 - Elección del andamio*

20

El análisis mostró que el suministro de tejido donante humano neonatal puede ser insuficiente para la demanda. Por lo tanto, los andamios descelularizados derivados de animales se probaron junto con andamios fabricados derivados de células humanas.

25

Cuando se comparó *in vivo*, el tejido porcino descelularizado permaneció intacto mientras que los andamios derivados de células humanas fabricados se degradaron, confirmando así la superioridad del tejido porcino.

30

#### *Ejemplo 13 - Ejemplo de protocolo para la generación de un esófago modificado mediante ingeniería tisular como terapia autóloga para neonatos:*

35

1. Cosechar el esófago porcino, colocarlo en una solución de almacenamiento y transportarlo al sitio de fabricación de GMP.

40

2. Descelularizar usando 2 (dos) ciclos del protocolo DET (agua durante 24 h a temperatura ambiente, desoxicolato de sodio durante 4 horas a temperatura ambiente y DNasa durante 3 horas a temperatura ambiente), irradiar el andamio (para esterilizar) y almacenar en solución tamponada.

45

3. Inyectare el andamio descelularizado con mesoangioblastos y fibroblastos. Los mesoangioblastos se derivan de una biopsia muscular del paciente, los fibroblastos de una biopsia de piel, ambos se pueden tomar conjuntamente de la pared abdominal en el momento del procedimiento de gastrostomía para el recién nacido.

50

4. Cultivar el andamio sembrado en la cámara en medios de proliferación definidos durante dos días, y en medios de diferenciación definidos durante 9 días mantenidos a 37 ° C humidificado con 5% de CO<sub>2</sub> con control externo de las condiciones de la cámara a través de un biorreactor controlador.

55

5. Entregar células epiteliales en el lado luminal del andamio esofágico (células primarias derivadas de una biopsia del esófago vestigial existente del paciente).

6. Después de un cultivo adicional, transportar al quirófano en la cámara y extraer para trasplantar al paciente.

#### *Ejemplo 14 - Evaluación de fibroblastos usados en los ejemplos 15 a 18*

60

Los fibroblastos de ratón (mFB) utilizados en todos los experimentos de siembra conjunta descritos a continuación se aislaron de los músculos esqueléticos de las extremidades posteriores del ratón de tipo salvaje (*extensor digitorum longus-EDL*) y diafragmados a través de la digestión enzimática y recubiertos para expansión. Las células mostraron morfología y tamaño alargado clásico y fueron positivas para KI67 cuando se expandieron en el cultivo, exhibiendo capacidad de proliferación para varios pasajes (figura 23).

65

Los fibroblastos también fueron positivos para marcadores clásicos como Vimentin y TCF-4.

*Ejemplo 15 - Análisis de distribución celular esquemática en experimentos de siembra celular en andamios de ratas descelularizadas*

5 Andamios de ratas descelularizadas sembrados con hMAB o hMAB + mFB (relación 85:15) y cultivados en condiciones estáticas se fijaron, seccionaron y se tiñeron para núcleos humanos y DAPI tal y como se describió previamente. Las secciones se escanearon para detectar y contar todas las células presentes en el andamio y crear una distribución esquemática de las células (figura 24A). De la colección de distribución esquemática y polar (distribución celular corregida asumiendo una sección perfectamente circular, figura 24A, B) detectamos una clara mejora en el injerto celular y la homogeneidad de la distribución alrededor de la sección de tejido en andamios sembrados con hMAB + mFB en comparación con hMAB solo. El recuento del número total de células por área confirmó esta tendencia ( $n \geq 3$ , figura 24C).

15 *Ejemplo 16 - Investigación de la migración celular en andamios sembrados con hMAB o hMAB + mFB*

20 Para evaluar la capacidad de migración de hMAB sembrado con o sin mFB en el andamio descelularizado de rata, se sembró hMAB transducido con un lentivirus de luciferasa ZS Green (ZsGreen+Luc+hMABs). La transducción de las células se confirmó usando citometría de flujo y se obtuvo una población pura de células transducidas usando la clasificación FACS. La imagen de bioluminiscencia (BLI del inglés "bioluminescence imaging") se usó para rastrear las células en el andamio usando un Sistema de imagen *in vivo* (IVIS del inglés "In Vivo Imaging System"). Las células se rastrearon de forma no invasiva para la migración cada 24 h (figura 25A). Se detectó BLI con éxito de las células sembradas y las imágenes se analizaron para cuantificar la radiación emitida cada 24 h (figura 25B). Para calcular la migración de las células, se determinó BLI a partir de 8 diferentes regiones de interés (ROI) ubicadas desde el centro del punto de inyección (figura 25C).

30 La radiación medida en las ROI de 3 a 6 (ROI centrales) después de 1 día de cultivo resaltó un BLI más alto en andamios sembrados con hMAB solo (triángulos, figura 25D). Esto estaba perfectamente en línea con la configuración experimental ya que solo hMAB eran Luc+ y su número inicial fue mayor con respecto a la condición de siembra conjunta (relación 85:15). Sin embargo, después de una disminución esperada en el número de células en los días siguientes, a los 3 y 5 días de cultivo, la radiancia total detectada a partir de los andamios (cuadrados) hMAB + mFB fue comparable o más alta que las que tenían solo hMAB, mostrando un claro crecimiento celular y migración en las diferentes ROI en todo el cultivo. En el día 5, los andamios de siembra conjunta mostraron una mayor luminosidad en comparación con hMAB solo, en particular en las ROI 3 y 6 más lejos del punto de inyección (entre ROI 4 y 5), destacando la presencia de un mayor número de células que migran a lo largo del andamio (figura 25D).

40 La migración celular se determinó también usando el ensayo de viabilidad MTT, que permitió la visualización de células en los andamios sembrados después de 6 días de cultivo (figura 26). Se cultivaron andamios tubulares sembrados con  $8,5 \times 10^5$  hMAB o  $1 \times 10^6$  hMAB con o sin mFB (relación 85:15) en condiciones estáticas durante 6 días y luego se incubaron con solución de MTT durante 4 horas. Las células formazan-positivas fueron visibles dentro del andamio destacando las diferencias en el patrón de migración y la extensión entre las 3 condiciones (figura 26A). Las imágenes de andamios planos abiertos se analizaron para determinar la migración celular midiendo la intensidad del color a lo largo de 8 líneas aleatorias dibujadas radialmente desde el centro de los grupos de células hasta el borde del andamio usando el software ImageJ (línea representativa A-B, en el centro de la figura 26A). Se utilizó el gráfico del valor Gray obtenido de todas las líneas para calcular la distancia en píxeles cubiertos por las células, considerando la distancia entre las dos mesetas (gráfico representativo y medida en la figura 26B). La distancia promedio en mm cubierta por las células en los andamios de siembra conjunta fue mayor que las otras dos condiciones con hMAB solo ( $n=3$ , recuento realizado por 3 operadores independientes a ciegas, figura 4C), confirmando la misma tendencia determinada con BLI y cuantificación con IVIS.

55 *Ejemplo 17 - Investigación más profunda de la distribución celular en andamios de siembra conjunta hMAB + mFB cultivados en condiciones estáticas y dinámicas*

60 Se tiñeron y escanearon secciones de esófagos de ratas descelularizadas sembradas conjuntamente con hMAB + mFB y cultivadas en condiciones estáticas o dinámicas, tal y como se describió previamente, a fin de detectar y contar todas las células presentes en el andamio. La distribución esquemática de las células (figura 27A) y la distribución polar (distribución celular corregida asumiendo una sección perfectamente circular, figura 27B) mostraron un crecimiento global del tejido y una mejor homogeneidad de distribución alrededor de la sección del tejido en andamios cultivados en el biorreactor en comparación con la condición estática. El recuento del número total de células por área confirmó esta diferencia significativa ( $n \geq 3$ ,  $*p < 0,05$ , figura 27C). La proporción entre hMAB y mFB en andamios cultivados en condiciones dinámicas

se determinó a partir del recuento celular en secciones aleatorias teñidas para DAPI y núcleos humanos para evaluar el posible crecimiento excesivo de fibroblastos. Después de 11 días de cultivo, estaba presente mFb solo para el 14% del número total de células, sin mostrar una expansión incontrolada de estas células dentro del andamio ( $n \geq 3$ , figura 27D).

5

Además, usando el IVIS para rastrear las células sembradas en el andamio de ratas (Luc+hMAB+mFB) y cultivadas en el biorreactor de vidrio durante 7 días, se pudo visualizar la distribución celular a lo largo del andamio en todo el cultivo (figura 28A). Las imágenes IVIS se recolectaron en diferentes momentos, mostrando una clara invasión celular a partir de los puntos de inyección (grupos de lectura verde-amarillo en el día 1) hacia una distribución más homogénea y cobertura tisular en el día 7. Los valores de radiación detectados a partir de las imágenes recolectadas en los diferentes momentos resaltaron una disminución en el número de células después de los primeros días de cultivo, recuperados después de 7 días (figura 28B).

10

15

*Ejemplo 18 - Nivel de proliferación y diferenciación de mesoangioblastos en condiciones estáticas y dinámicas en presencia de fibroblastos.*

20

Las secciones de esófago de rata descelerizado de siembra conjunta con hMAB + mFB y cultivadas en condiciones estáticas o dinámicas, se tiñeron para núcleos humanos, SM22 (marcador de diferenciación de músculo liso) y DAPI y se escanearon tal y como se describió previamente a fin de detectar y contar todas las células presentes en el andamio (área negra, figura 29A). La distribución esquemática representativa de las células en la figura 29A muestra la discriminación automatizada entre los tipos de células diferenciadas: SM22+hMAB; SM22+mFB; SM22-hMAB; SM22-mFB, todo en escala de grises. Los mapas resaltaron la distribución de células diferenciadas en andamios cultivados en el biorreactor en comparación con la condición estática. Cuando el biorreactor estaba proporcionando estimulación mecánica y un mejor acceso a los medios de diferenciación, las células SM22+ estaban presentes en todas las capas del andamio y se distribuían homogéneamente, mientras que las construcciones cultivadas en condiciones estáticas mostraban células del músculo liso solo en la superficie de la matriz (figura 29A, C).

25

30

El cálculo del porcentaje de las células SM22+ después del cultivo estático y dinámico contadas en imágenes aleatorias de diferentes secciones ( $n \geq 3$ ) confirmaron el porcentaje significativamente mayor de células diferenciadas de músculo liso en andamios cultivados en el biorreactor (\*\* $p < 0,001$ , figura 29B). Curiosamente, alrededor del 10% de las células SM22+ eran fibroblastos y su contribución fue comparable en las dos condiciones de cultivo. En muestras cultivadas dinámicas sembradas conjuntamente con hMAB + mFB, la diferenciación madura hacia el músculo liso se confirmó adicionalmente con la inmunotinción para  $\alpha$ SMA y calponina (figura 30). Las células mostraron expresión conjunta de SM22 y de  $\alpha$ SMA y calponina en todas las capas del andamio, lo que demuestra un nivel maduro de diferenciación.

35

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Procedimiento para producir la construcción de un tejido adecuado para su implantación en un sujeto, que es preferiblemente un sujeto humano, el procedimiento comprende las etapas de:
- (i) proporcionar un andamio acelular;
  - 10 (ii) sembrar una combinación de mesoangioblastos y células de fibroblastos en y/o sobre el andamio; y
  - (iii) cultivar el andamio sembrado para producir la construcción, en donde la proporción de mesoangioblastos : fibroblastos usados para la siembra es de 50:50 a 99:1.
- 15 en el que la proporción de mesoangioblastos: fibroblastos usados para la siembra es de 50:50 a 99: 1.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la construcción de tejido es adecuada para su implantación en un órgano luminal tal como el esófago o el intestino, o para reemplazar el órgano, en el que la construcción de tejido es opcionalmente una construcción esofágica adecuada para un neonato o un bebé.
- 20 3. Procedimiento según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la relación de mesoangioblastos : fibroblastos utilizados para la siembra es de 65:35 a 90:10; de 70:30 a 90:10; de 80:20 a 90:10; o de 83:17 a 87:13; o es de alrededor de 85:5.
- 25 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las células se siembran:
- (a) simultáneamente; o
  - 30 (b) secuencialmente dentro o alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 24, 36 o 48 horas entre sí.
- 35 5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que las células se administran en un medio líquido o gel, en el que la concentración total de células en el medio está opcionalmente entre  $1 \times 10^8$  a  $1 \times 10^{10}$  células / ml.
- 40 6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la siembra se hace en el andamio mediante inyección, preferiblemente en una capa muscular del andamio en el que opcionalmente:
- (a) el volumen de inyección es de 1 a 50  $\mu\text{L}$  o de 5 a 10  $\mu\text{L}$ , y/o
  - (b) el caudal utilizado para sembrar las células está en el rango de 1 a 25  $\mu\text{L/s}$ , ó de 1 a 10  $\mu\text{L/s}$ , y/o
  - 45 (c) la siembra comprende múltiples inyecciones para lograr una densidad de células de al menos 105, 106 o 107 células/5mm de longitud, más preferiblemente una densidad de aproximadamente 106 células/5mm de longitud.
- 50 7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que:
- (a) las células mesoangioblásticas y fibroblásticas son autólogas y/o
  - (b) las células se obtienen mediante biopsia, y/o
  - 55 (c) las células mesoangioblásticas se pasan [o subcultivan] al menos dos veces antes de la siembra.
- 60 8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el andamio es tubular.
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el andamio es sintético.
10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el andamio está descelularizado, y opcionalmente es:
- 65 (a) derivado de un órgano luminal, y/o

- (b) de origen no humano, por ejemplo, un derivado porcino, más preferiblemente un esófago de lechón descelularizado.

5 11. Procedimiento según la reivindicación 10, que comprende las etapas de:

- (ia) proporcionar un andamio derivado de una fuente biológica;
- (ib) descelularizar el andamio para proporcionar un andamio acelular.

10 12. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que después de la siembra de las células en el andamio, se permite que las células se adhieran al andamio durante un período de tiempo antes de colocar el andamio sembrado en medio de cultivo.

15 13. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que después de sembrar el andamio, la construcción se cultiva en condiciones estériles en uno o más medios adecuados para el crecimiento y la diferenciación de las células mesoangioblásticas en un biorreactor, y opcionalmente:

- 20 (a) el andamio se cultiva en condiciones de cultivo estático seguido de condiciones de cultivo dinámicas, y/o
- (b) el andamio se cultiva en condiciones de cultivo dinámico durante 3 a 28 días, opcionalmente 4 y 21 días, opcionalmente 4 y 14 días,

25 en donde en cada caso durante el cultivo dinámico el medio se cambia opcionalmente de un medio de proliferación a un medio de diferenciación, por ejemplo al menos 1 día con un medio de proliferación y al menos 6 días con un medio de diferenciación, y/o

- (c) las condiciones de cultivo someten la construcción a fuerzas pulsátiles o peristálticas, y/o
- 30 (d) el biorreactor incorpora un casete extraíble que se puede transferir desde un biorreactor de descelularización, someter a una siembra y luego introducir en un biorreactor de recelularización.

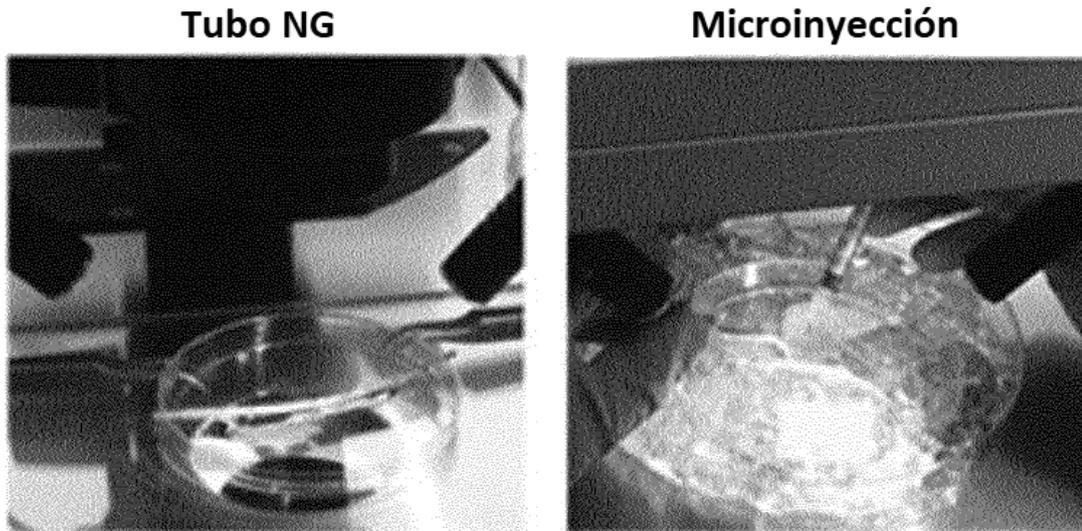
35 14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende una etapa adicional de epitelizar la construcción de tejido en al menos una superficie, en la que opcionalmente la construcción tiene una forma luminal y se epiteliza en la superficie luminal interna.

40 15. Construcción tisular obtenida u obtenible de acuerdo con el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, cuya construcción es opcionalmente una construcción esofágica o una construcción intestinal adecuada para su implantación en un recién nacido, bebé, niño o adulto.

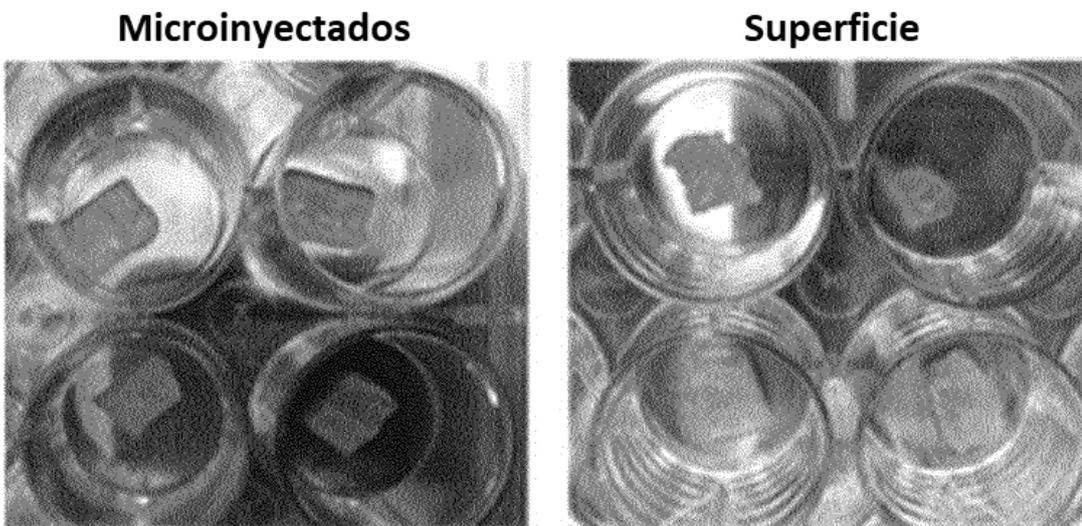
16. La construcción de la reivindicación 15 para usar en el tratamiento tisular o en el daño o pérdida de órganos o para su uso en la reparación o en el remplazo de un tejido u órgano en un sujeto, en donde

- 45 (a) la construcción opcionalmente comprende células autólogas obtenidas del sujeto, y/o
- (b) el sujeto es opcionalmente un neonato humano o un bebé que padece atresia esofágica, particularmente agenesia esofágica y la construcción es una construcción esofágica.

50

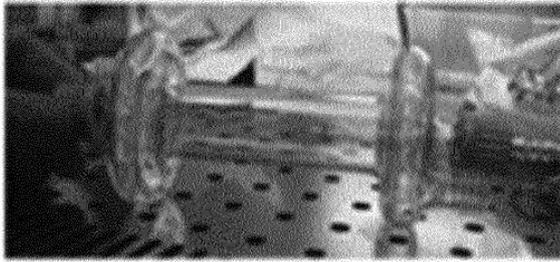


**Figura 1.**

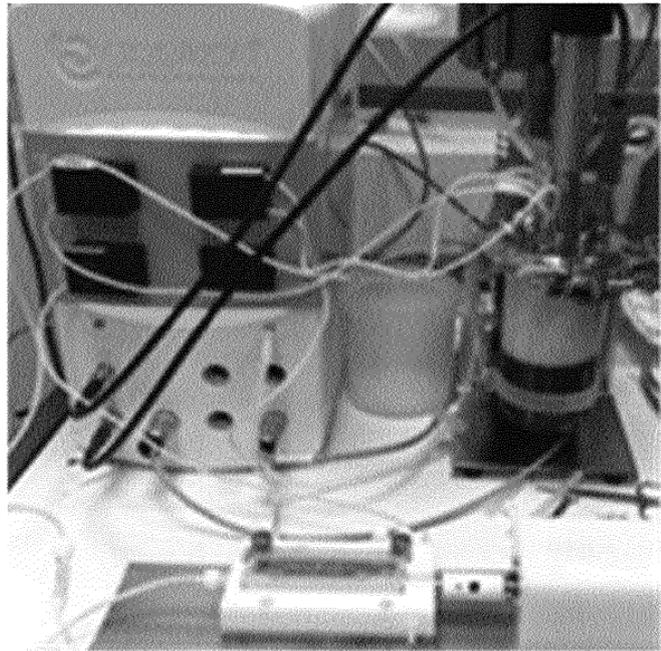


**Figura 2.**

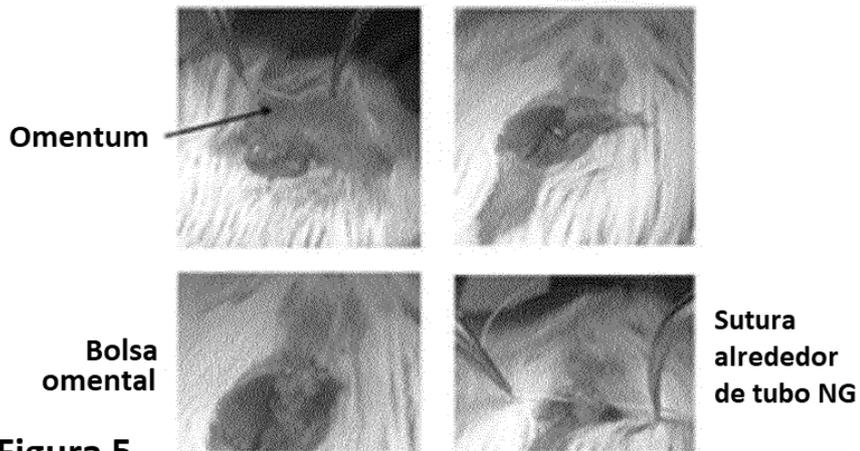
**Cámara vidrio hecha a medida**



**Figura 3.**



**Figura 4.**



**Figura 5.**

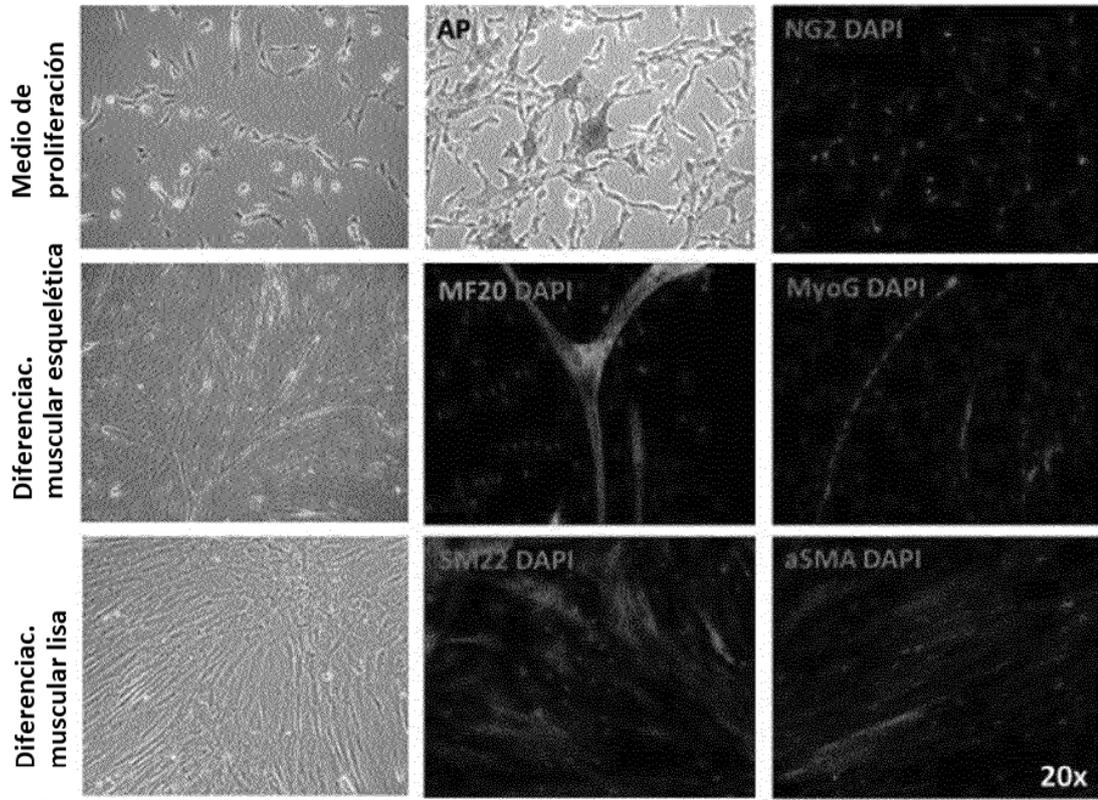


Figura 6.

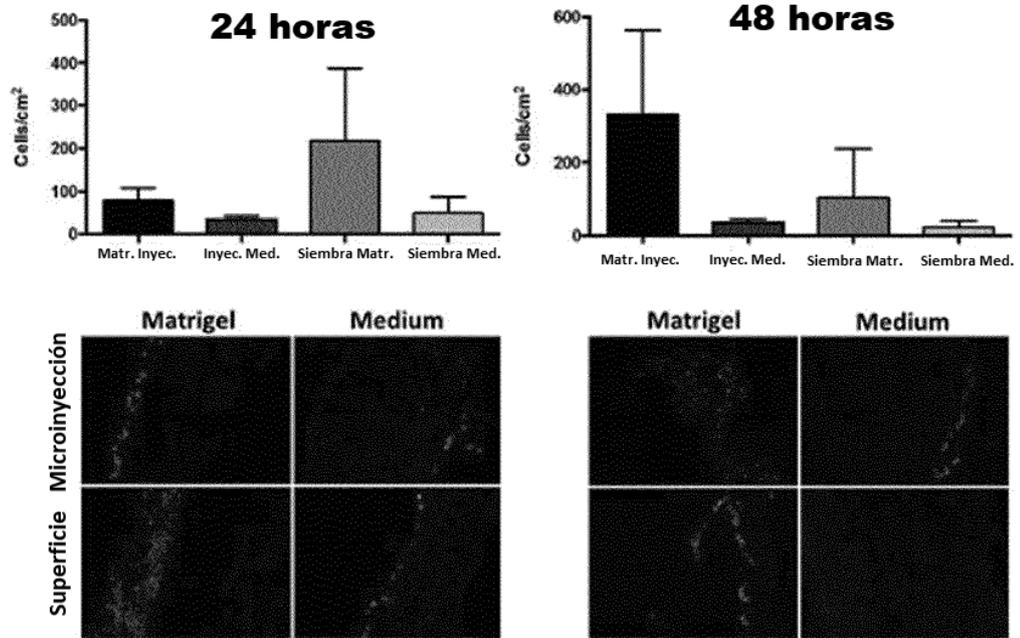
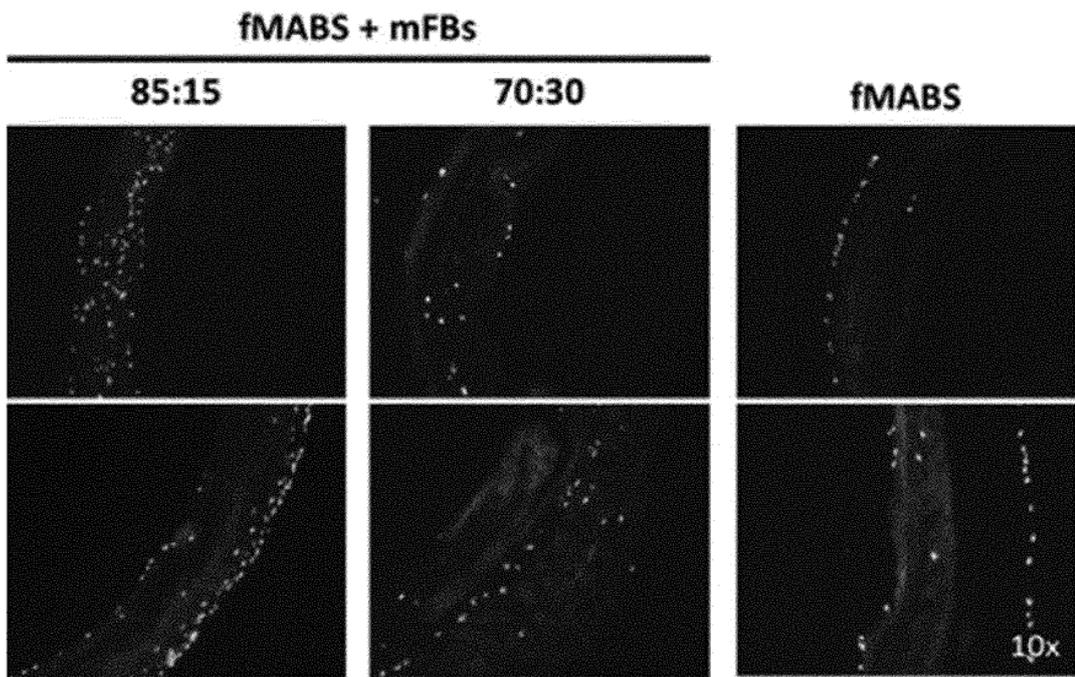
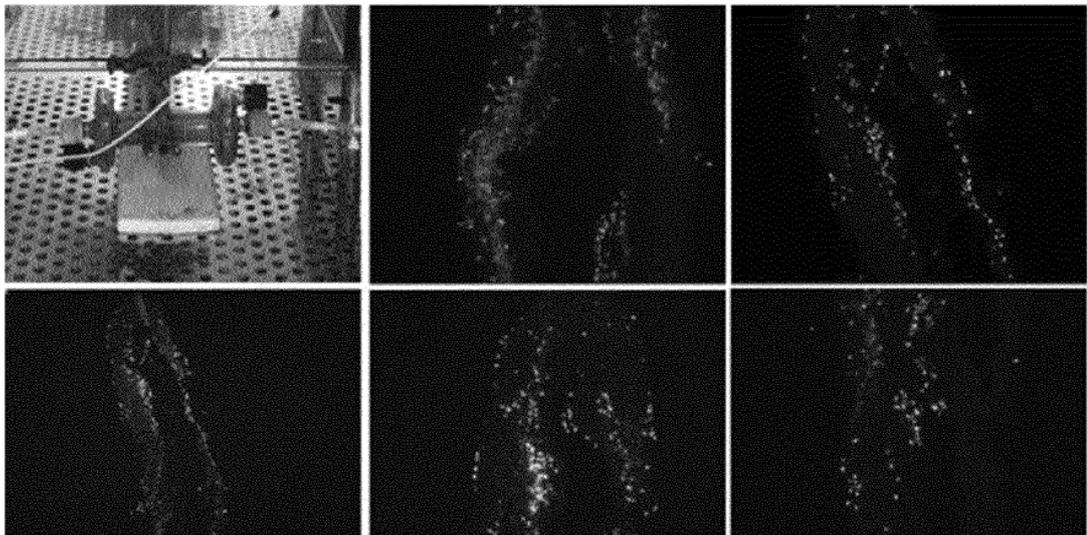


Figura 7.



**Figura 8.**



**Figura 9.**

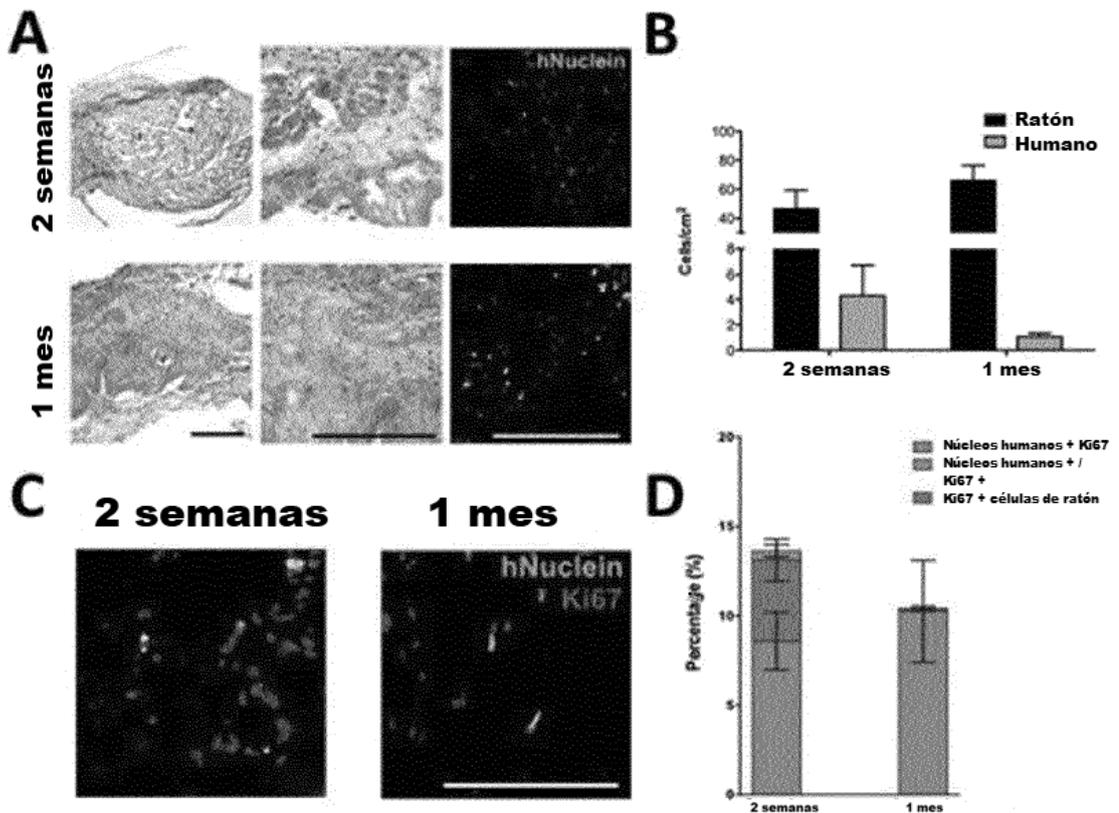


Figura 10.

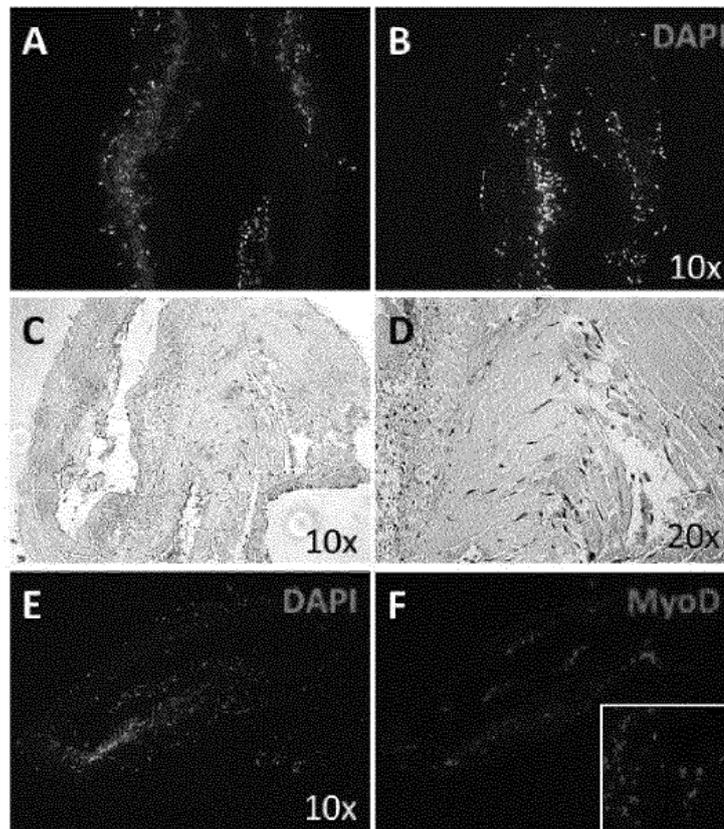


Figura 11.

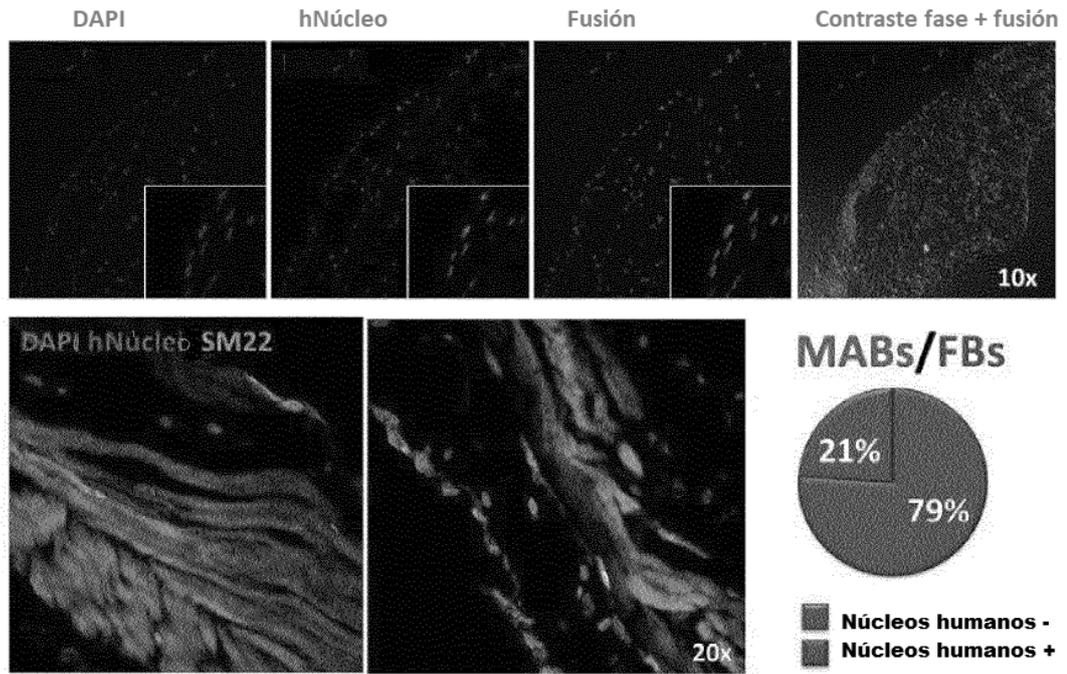


Figura 12.

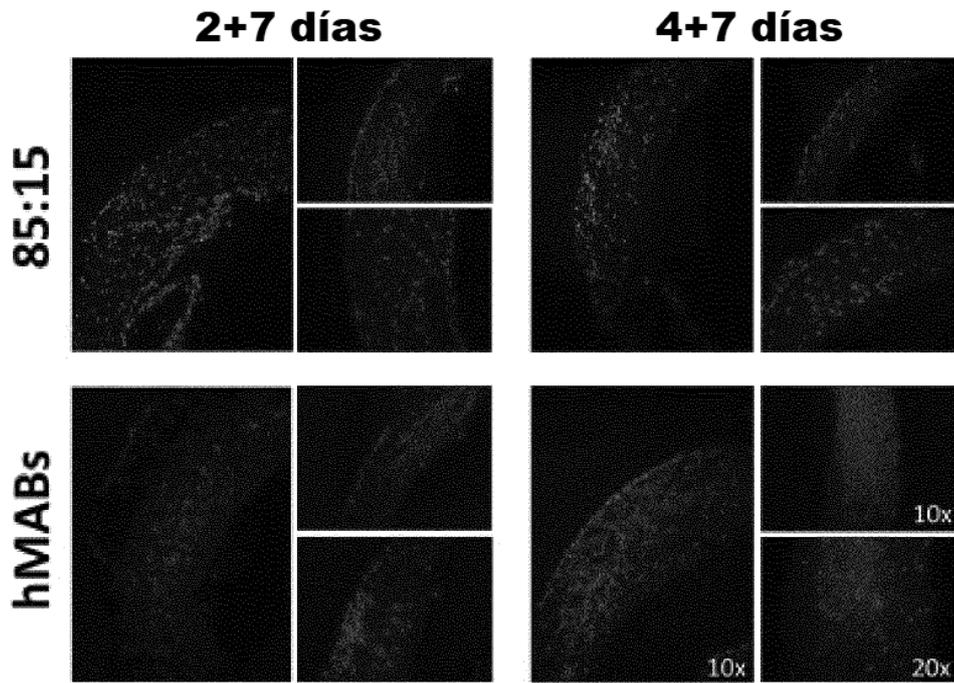


Figura 13.

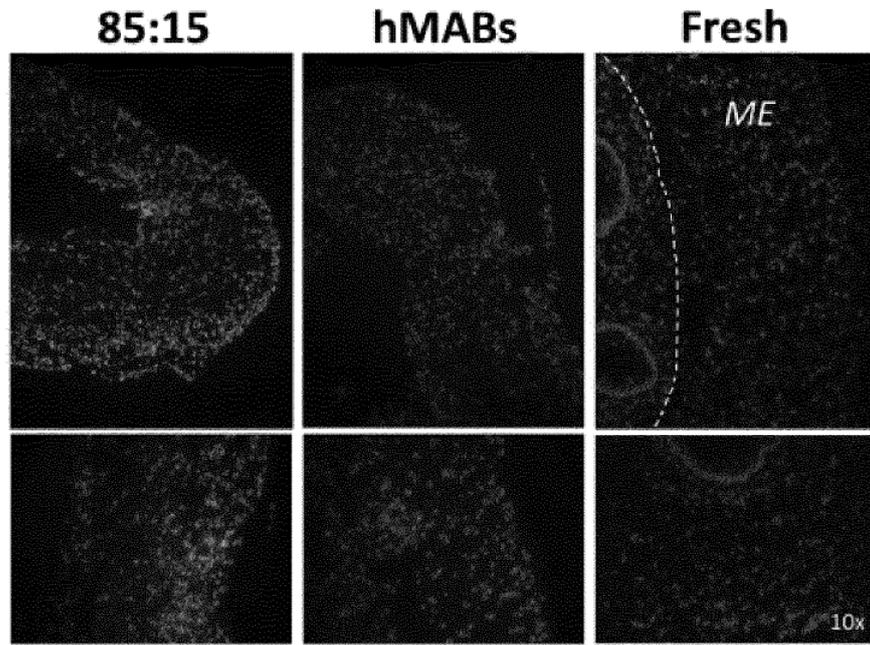


Figura 14

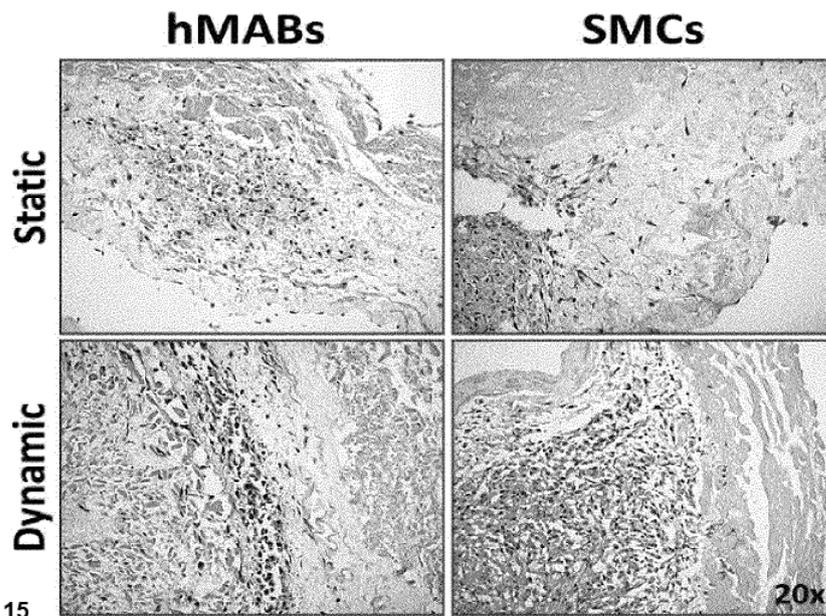


Figura 15

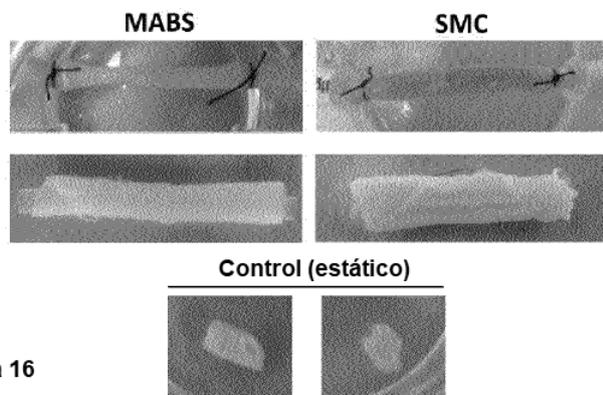


Figura 16

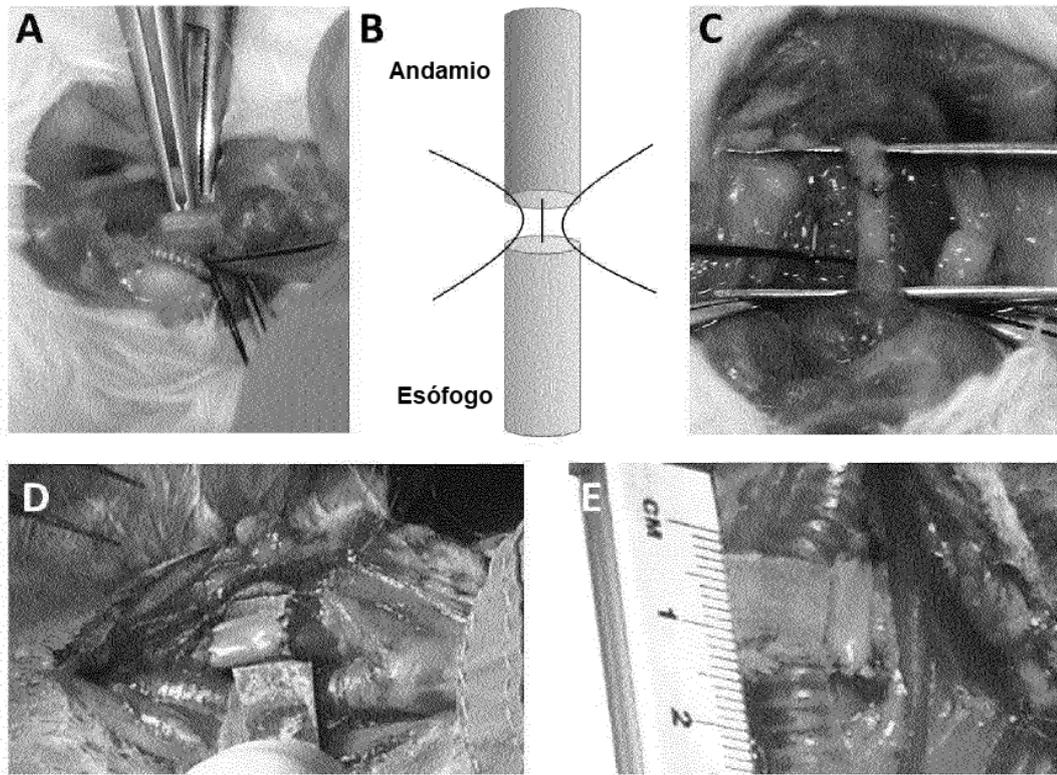


Figura 17.

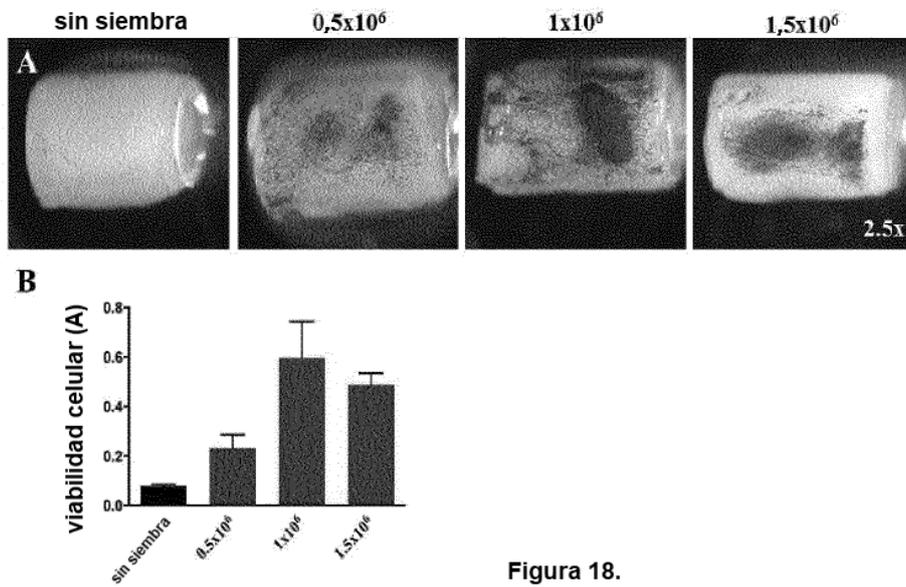


Figura 18.

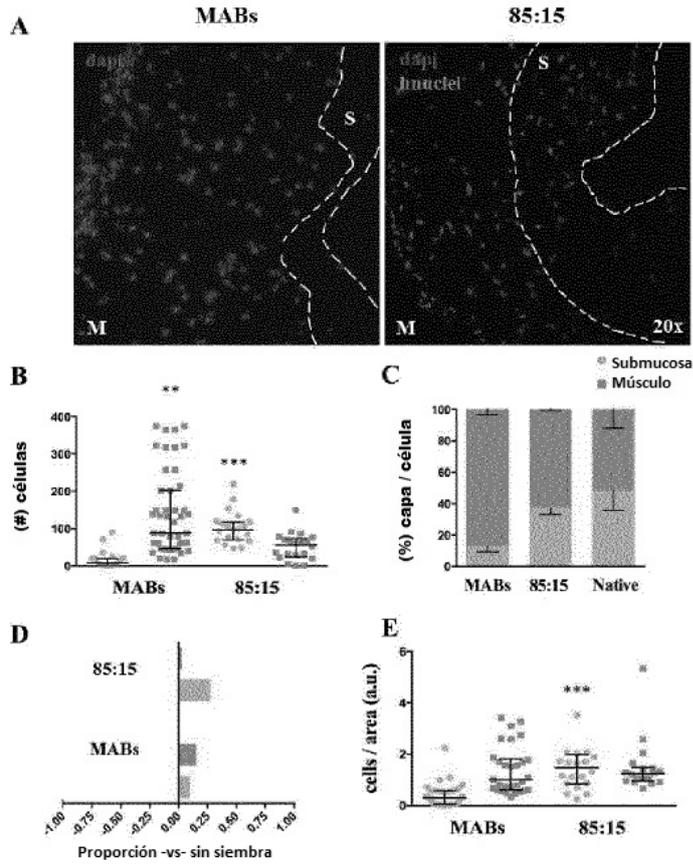


Figura 19.

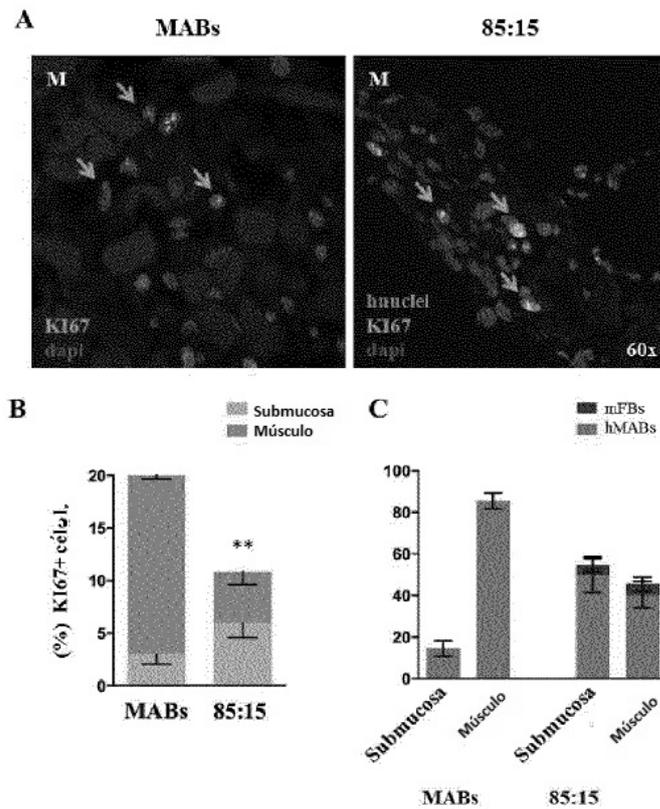


Figura 20.

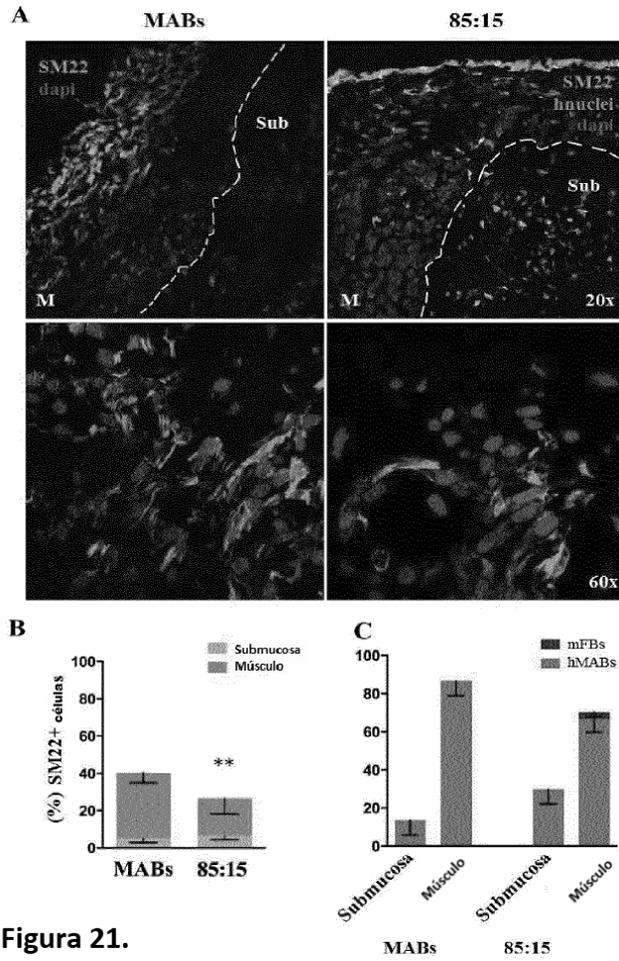


Figura 21.

## Resultados primarios cuantitativos

● Densidad celular = número células / área unidad

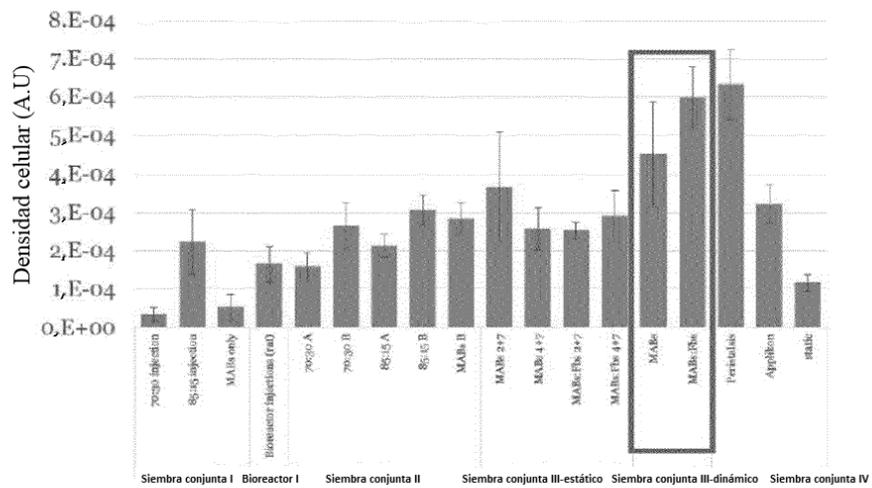
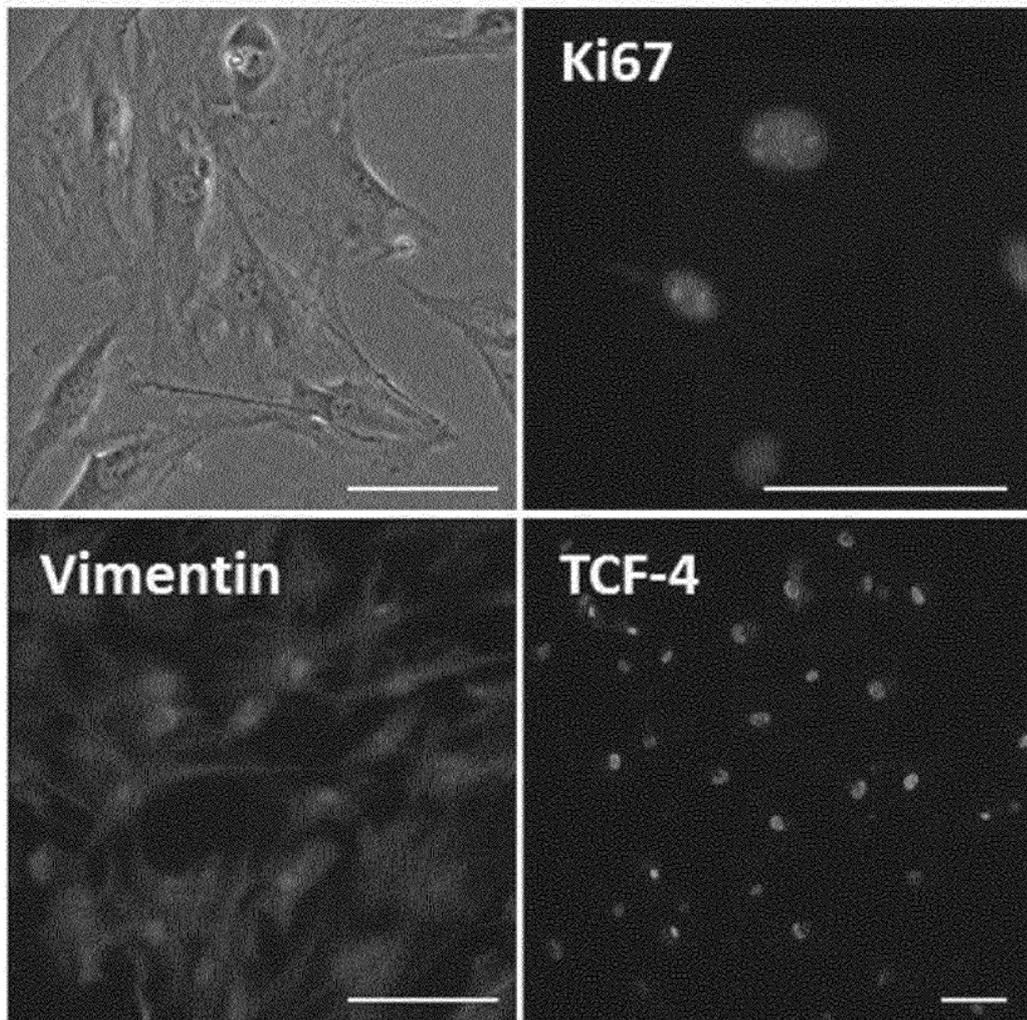


Figura 22.

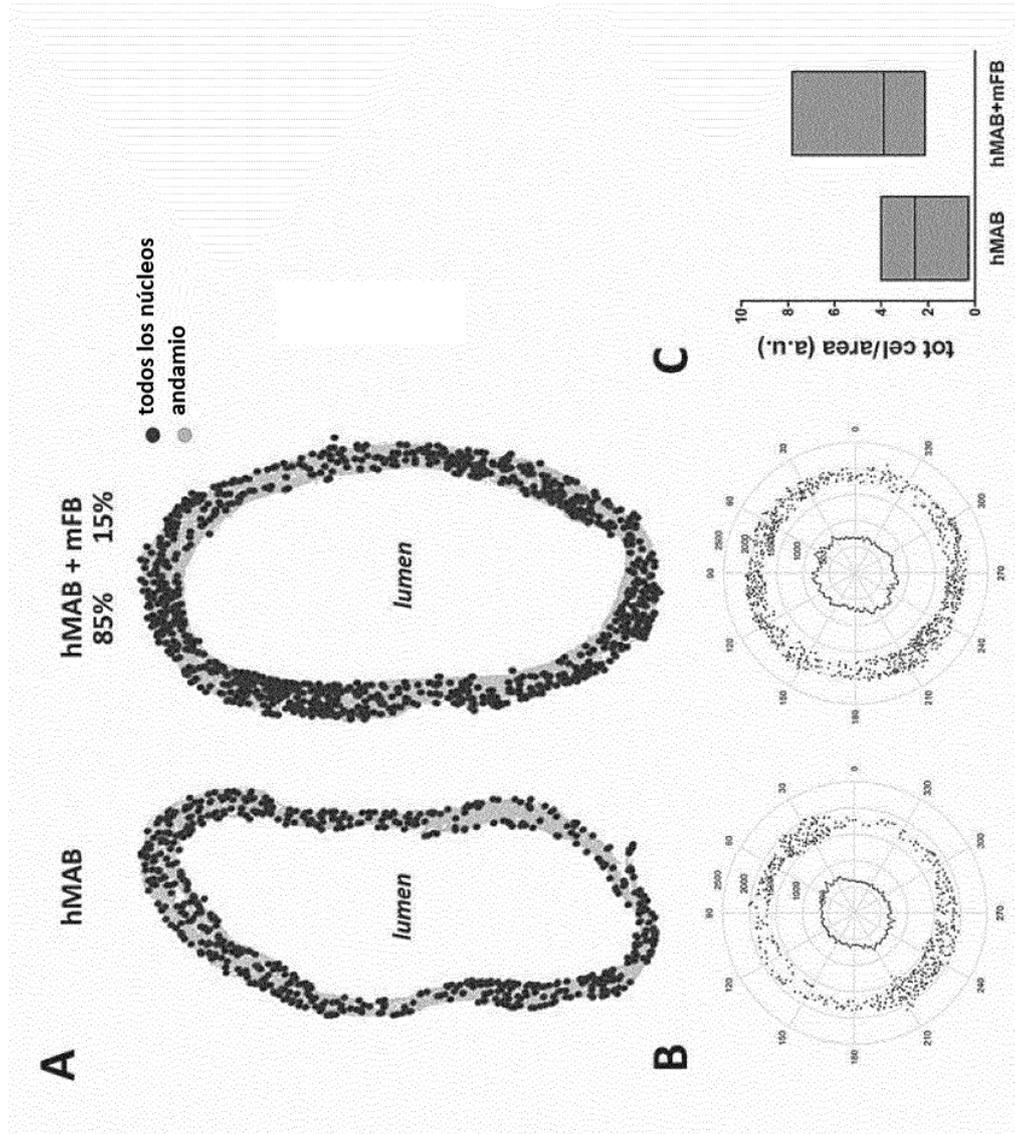
# Fibroblastos



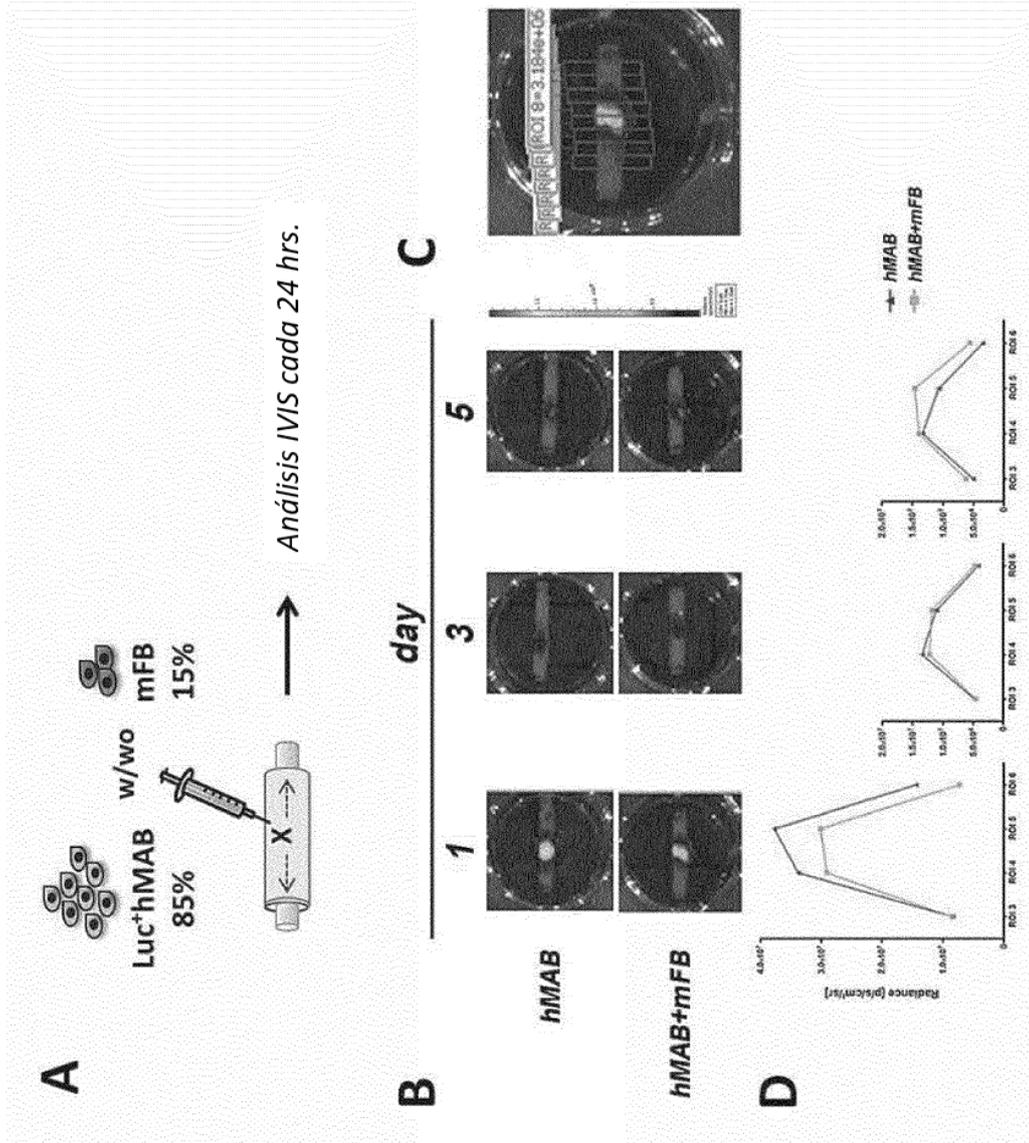
diafragma / ratón EDL



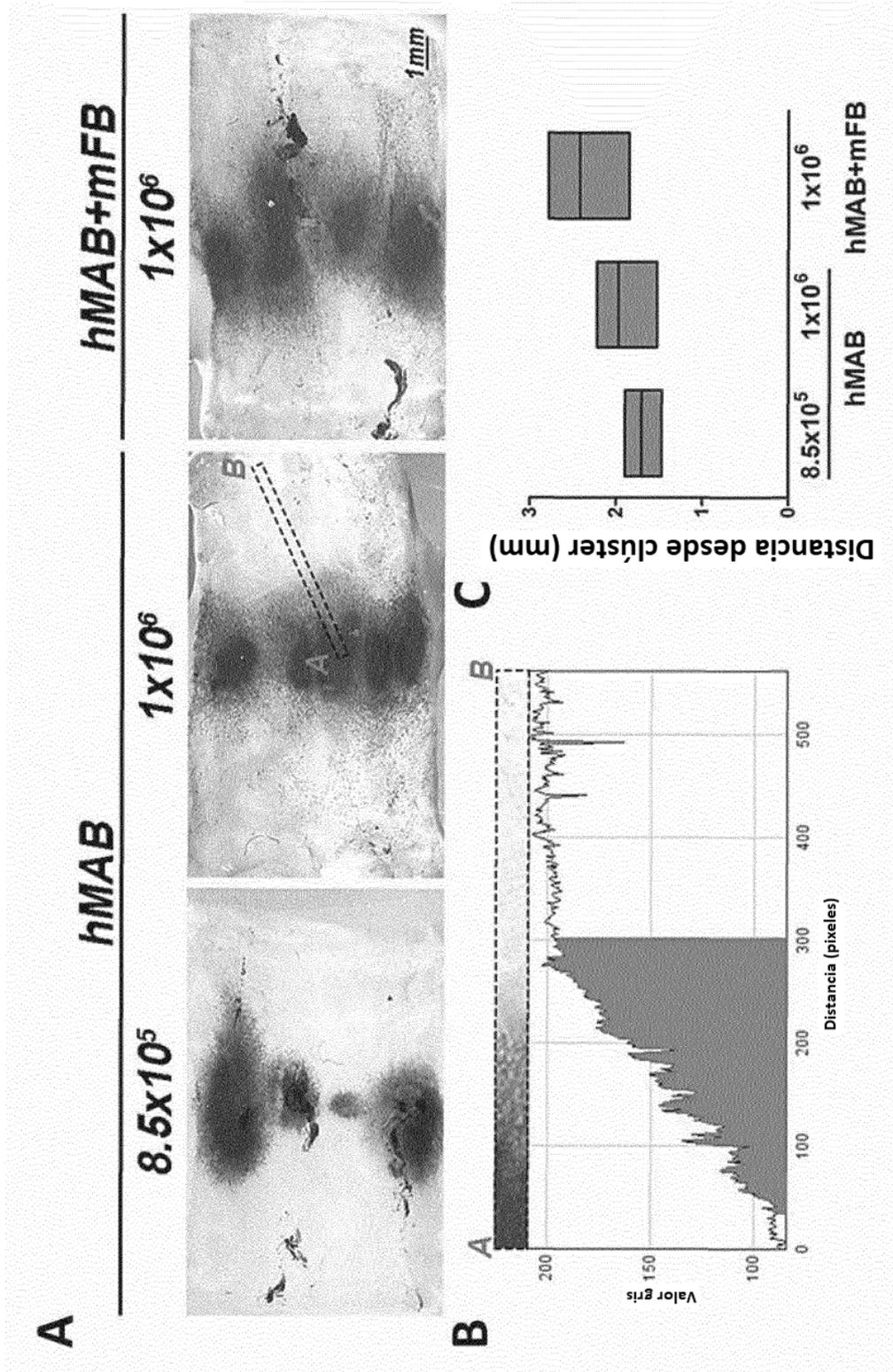
**Figura 23**



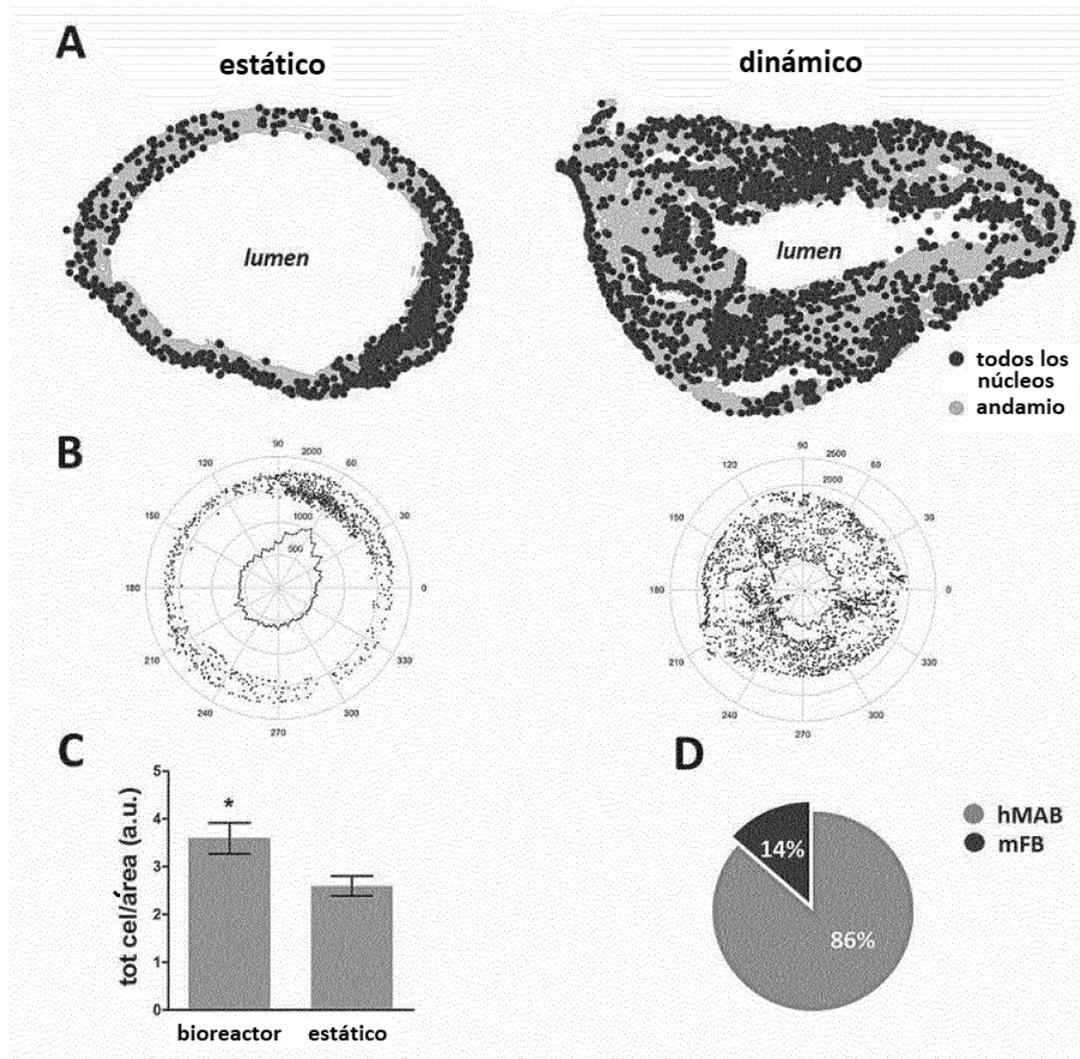
**Figura 24**



**Figura 25**



**Figura 26**



**Figura 27**

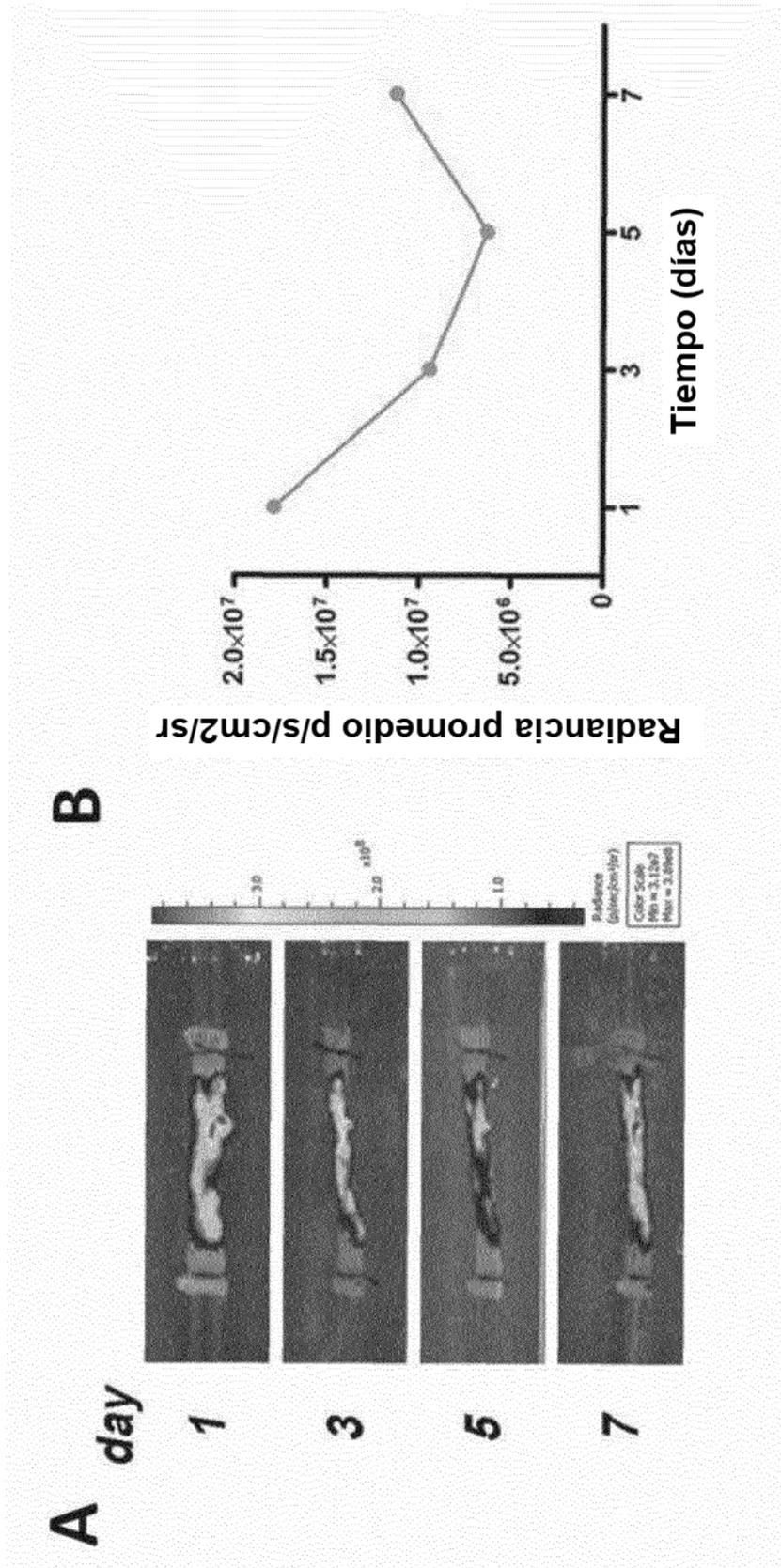
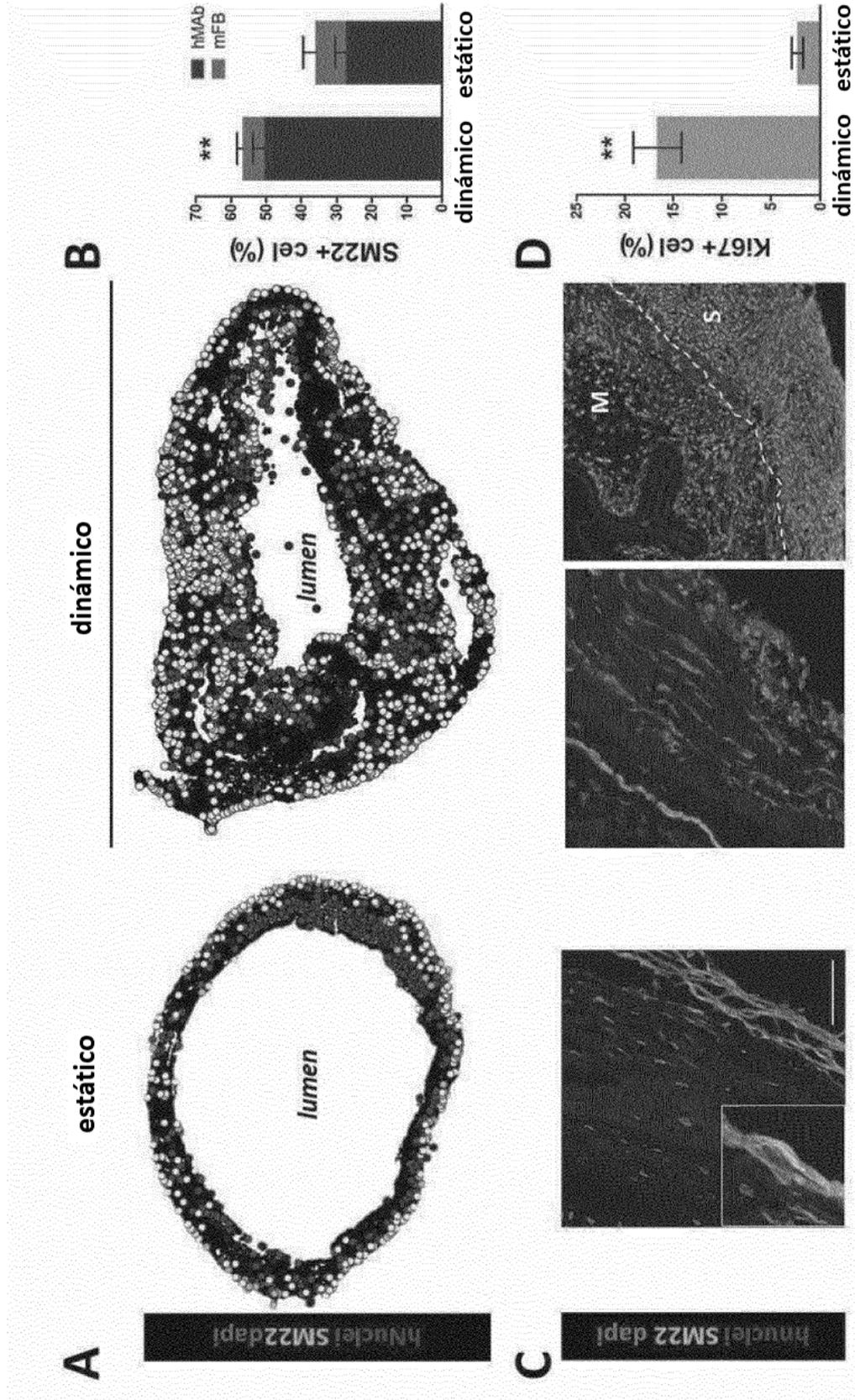


Figura 28



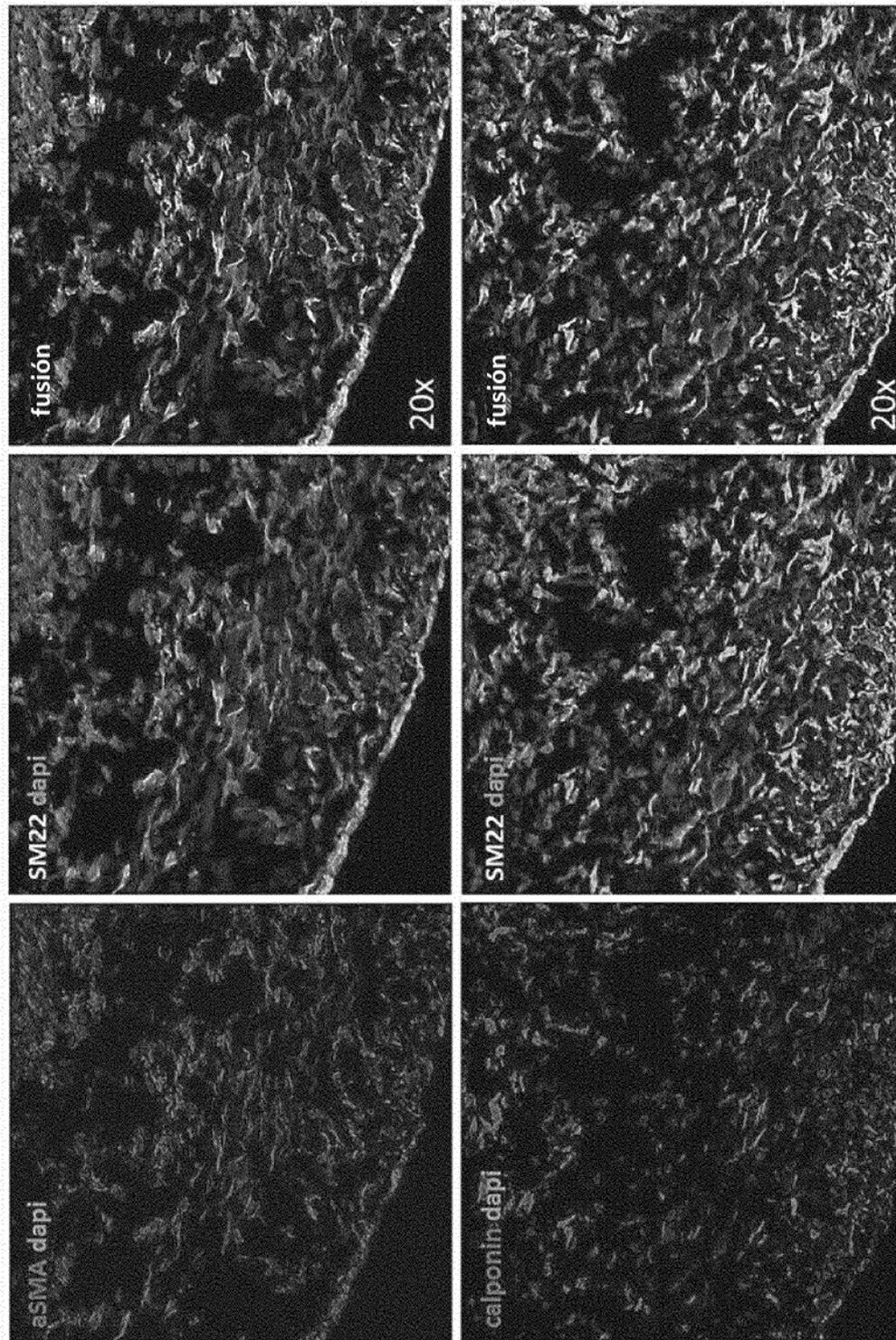


Figura 30