

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 996 660**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/00** (2006.01)  
**A61L 27/14** (2006.01)  
**A61L 27/40** (2006.01)  
**A61L 27/50** (2006.01)  
**A61L 27/52** (2006.01)  
**A61L 27/54** (2006.01)  
**A61L 27/38** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2017** **PCT/US2017/067141**  
87 Fecha y número de publicación internacional: **21.06.2018** **WO18112480**  
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2017** **E 17882010 (6)**  
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2024** **EP 3555263**

54 Título: **Interposición de película delgada para andamios de membrana basal**

30 Prioridad:

**16.12.2016 US 201662435121 P**  
**03.10.2017 US 201762567748 P**  
**03.10.2017 US 201762567746 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la  
traducción de la patente:  
**13.02.2025**

73 Titular/es:

**IVIVA MEDICAL, INC. (100.00%)**  
**1 Cabot Road**  
**Medford, MA 02155 , US**

72 Inventor/es:

**KLASSEN, CHARLES, C.**

74 Agente/Representante:

**TORO GORDILLO, Ignacio**

ES 2 996 660 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

Interposición de película delgada para andamios de membrana basal

## 5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de EE.UU. N.º 62/435.121, presentada el 16 de diciembre de 2016, la Solicitud Provisional de EE.UU. N.º 62/567.746, presentada el 3 de octubre de 2017 y la Solicitud Provisional de EE.UU. N.º 62/567.748, presentada el 3 de octubre de 2017.

## 10 Antecedentes de la invención

La bioingeniería de tejidos e injertos de órganos a escala humana requiere la generación de una matriz que proporcione el contexto tridimensional para que las células residan y cumplan su función, y que suministre un sistema vascular perfundible para satisfacer las respectivas demandas metabólicas de los tejidos. Estas matrices o andamios se han generado usando técnicas que incluyen litografía, estereolitografía, electrohilado, fotopolimerización e impresión por extrusión entre otras técnicas. Hasta la fecha, la creación de una red de canales vasculares ha sido un factor limitante importante en este proceso. Más recientemente, técnicas tales como la impresión 3D multidireccional usando tinta fugitiva han permitido la generación de redes de canales tridimensionales dentro de un bloque sólido de material. Esta técnica puede aplicarse para generar tejidos sólidos tales como músculo esquelético o cartílago.

En contraste con estos ejemplos, los tejidos y los órganos que contienen una o más estructuras epiteliales (digestivo, endocrino, nervioso, linfático, integumentario, reproductor, respiratorio, sensorial, urinario y circulatorio) dependen de la presencia de una membrana basal delgada que permite funciones tales como la filtración de líquido (riñón, ojo, linfático, cerebro, difusión de gases (pulmón), secreción y absorción de electrolitos y otras moléculas (riñón, intestino, hígado, tejido entérico) y difusión de hormonas (páncreas, hipófisis, glándula suprarrenal) de un lumen o compartimento a otro. Un ejemplo de una estructura de riñón diseñada se muestra en el documento US8357528 B2. Sin embargo, en muchos casos, esta membrana basal debe tener un espesor de <1 µm o <10 µm para permitir la función (riñón, pulmón).

En la actualidad, los inventores no conocen ninguna tecnología que exista para generar un andamio que contenga una o múltiples redes de canales tridimensionales revestidas por dicha membrana basal. La tecnología de impresión aditiva tridimensional presenta importantes limitaciones debido a la resolución y las restricciones de material que hasta el momento han impedido el desarrollo de construcciones de tejidos que contengan estructuras vasculares fisiológicamente precisas.

## Sumario de la invención

En algunas realizaciones, la presente invención aborda la necesidad de un andamio que contenga una o múltiples redes de canales tridimensionales revestidas por una membrana basal, como se define en la reivindicación 1, y proporciona novedosos métodos para generar una red de canales tridimensionales revestida por una membrana basal de espesor y composición definidos, como se define en la reivindicación 9. Esta construcción vascular puede embeberse en material de soporte con o sin células y puede repoblarse con revestimiento de células epiteliales para permitir una función de nivel superior.

Algunas realizaciones de la invención están dirigidas a una composición (por ejemplo, construcción de membrana basal, construcción de membrana basal vascularizada, tejido, órgano) que comprende una o más películas delgadas (también denominadas a veces en el presente documento una membrana, una membrana de película delgada o un componente de membrana de película delgada) que define un volumen interior (por ejemplo, un compartimento luminal), en donde la una o más películas delgadas comprenden material de membrana basal funcional. En algunas realizaciones, el volumen interior tiene un lado superior y un lado inferior, y una película delgada define el lado superior y un polímero o hidrogel define el lado inferior (por ejemplo, el volumen interior está emparedado entre la película delgada y la membrana basal). En algunas realizaciones, una película delgada define tanto el lado superior como el lado inferior (por ejemplo, el volumen interior está emparedado entre una o dos películas delgadas).

En algunas realizaciones, al menos una película delgada es capaz de filtración de fluidos, difusión de gases, secreción o absorción de un electrolito y/o difusión de una hormona a través de la película delgada. Por ejemplo, una película delgada puede ser adecuada para realizar hemodiálisis, intercambio de gases sanguíneos para la respiración; la absorción de nutrientes en la sangre para la digestión o la introducción de una hormona en la sangre para funciones endocrinas.

La una o más películas delgadas tienen un espesor de 10 µm +/- 10 % o menos. En algunas realizaciones, la una o más películas delgadas tienen un espesor de 1 µm +/- 10 % o menos.

En algunas realizaciones, el volumen interior comprende uno o más canales (por ejemplo, al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 100, 200, 500, 750, 1000, 2000, 10000 canales). En

- 5 algunas realizaciones, el al menos un canal comprende una red de canales ramificados que tiene una o más ramificaciones con diámetros decrecientes (por ejemplo, al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 100, 200, 500, 750, 1000, 2000, 10000 ramificaciones). En algunas realizaciones, los diámetros del canal pueden incluir, pero no estar limitado a, aproximadamente 10 cm, 10 mm, 5 mm, 1 mm, 500 µm, 50 µm, 10 µm, 5 µm, 3 µm, 1 µm, 0,5 µm, 0,1 µm, 0,05 µm, 0,02 µm o 0,01 µm.
- 10 En algunas realizaciones, el volumen interior está conectado a un espacio exterior. Por ejemplo, el volumen interior puede tener un canal que se puede conectar operativamente a una arteria de un paciente y un canal conectado a una vena de un paciente, permitiendo el flujo sanguíneo a través del volumen interior (por ejemplo, a través de un volumen interior que forma una red vascular).
- 15 El volumen interior forma una red de canales vasculares. Por ejemplo, el volumen interior puede imitar la estructura de las redes vasculares en los pulmones, riñón, tracto digestivo u otros tejidos del cuerpo humano. En algunas realizaciones, la red de canales vasculares tiene un volumen de aproximadamente 0,01 ml a aproximadamente 10 l, de aproximadamente 0,1 ml a aproximadamente 5 l, de aproximadamente 1 ml a aproximadamente 1 l, de aproximadamente 10 ml a aproximadamente 0,5 l, de aproximadamente 50 ml a aproximadamente 250 ml o de aproximadamente 75 ml a aproximadamente 150 ml o cualquier intervalo entre los mismos.
- 20 El material de la membrana basal funcional comprende tejido descelularizado o matriz extracelular que se ha licuado u homogeneizado. En algunas realizaciones, el material funcional de la membrana basal comprende colágeno, gelatina, hidrogel, ácido poliláctico, quitosano y/u otros materiales biocompatibles o compuestos de estos materiales.
- 25 En algunas realizaciones, la película delgada está curada, reticulada, polimerizada, seca y/o gelificada.
- En algunas realizaciones, la composición comprende múltiples películas que definen múltiples volúmenes interiores en un espacio tridimensional. La composición comprende un primer volumen interior que es una red vascular para la sangre y un segundo volumen interior separado del primer volumen interior por una película delgada.
- 30 En algunas realizaciones, la composición comprende además un andamio celular. En algunas realizaciones, el andamio celular deriva de un tejido u órgano descelularizado.
- 35 En algunas realizaciones, la composición comprende además uno o más tipos celulares en el volumen interior y adheridos a la superficie de una o más películas delgadas. En algunas realizaciones, el uno o más tipos celulares incluyen un tipo de célula epitelial. "Célula epitelial" se refiere a una célula o células que revisten órganos huecos, así como los que forman las glándulas y la superficie externa del cuerpo. En general, pueden considerarse cuatro tipos de células epiteliales: células epiteliales escamosas, células epiteliales columnares, células epiteliales adenomatosas y células epiteliales transicionales. En algunas realizaciones, el tipo de célula epitelial se selecciona de células de la próstata, células mamarias, hepatocitos, células de los islotes pancreáticos incluyendo células beta, células epiteliales pulmonares, células renales, células de la vejiga, células epiteliales del estómago, células epiteliales del intestino grueso y delgado, células epiteliales uretrales, células epiteliales testiculares, células epiteliales del ovario, células epiteliales cervicales, células tiroideas, células paratiroides, células suprarrenales, células del timo, células de la vesícula biliar y células de la pituitaria.
- 40 En algunas realizaciones, la composición comprende además uno o más tipos celulares en el volumen interior y adheridos a la superficie de una o más películas delgadas. En algunas realizaciones, el uno o más tipos celulares incluyen un tipo de célula madre o célula progenitora. "Célula madre" se refiere a una célula o células que no están diferenciadas terminalmente y pueden producir, madurar o, de otra manera transformarse en células de un tipo diferente. Las células madre pueden incluir células madre pluripotentes, multipotentes, oligopotentes y unipotentes. Los ejemplos específicos de células madre incluyen células madre embrionarias, células madre fetales, células madre adultas y células madre pluripotentes inducidas (iPSC) (por ejemplo, véanse las Solicitudes Publicadas de EE.UU. N.º 2010/0144031, 2011/0076678, 2011/0088107, 2012/0028821).
- 45 En algunas realizaciones, la composición comprende un primer volumen interior que es una primera red vascular que comprende células endoteliales vasculares humanas y un segundo volumen interior que es una segunda red vascular que comprende células epiteliales renales humanas, en donde la composición, cuando se conecta al sistema de circulación sanguínea de un paciente, es capaz de realizar hemodiálisis. Por ejemplo, la composición puede usarse para suplementar o reemplazar el tejido renal de un paciente. En algunas realizaciones, la composición se implanta en el paciente. En algunas realizaciones, la composición es extracorpórea para el paciente.
- 50 En algunas realizaciones, la composición comprende un primer volumen interior que es una primera red vascular que comprende células endoteliales vasculares humanas y un segundo volumen interior que es una segunda red vascular que comprende células epiteliales pulmonares humanas, en donde la composición, cuando se conecta al sistema de circulación sanguínea de un paciente, es capaz de intercambiar gases. Por ejemplo, la composición puede usarse para suplementar o reemplazar el tejido pulmonar de un paciente. En algunas realizaciones, la composición comprende fibras elásticas que permiten la expansión y la contracción de la composición. En algunas realizaciones, la composición se implanta en el paciente. En algunas realizaciones, la composición es extracorpórea para el paciente.
- 55 En algunas realizaciones, la composición comprende un primer volumen interior que es una primera red vascular que comprende células endoteliales vasculares humanas y un segundo volumen interior que es una segunda red vascular que comprende células epiteliales pulmonares humanas, en donde la composición, cuando se conecta al sistema de circulación sanguínea de un paciente, es capaz de intercambiar gases. Por ejemplo, la composición puede usarse para suplementar o reemplazar el tejido pulmonar de un paciente. En algunas realizaciones, la composición comprende fibras elásticas que permiten la expansión y la contracción de la composición. En algunas realizaciones, la composición se implanta en el paciente. En algunas realizaciones, la composición es extracorpórea para el paciente.
- 60 En algunas realizaciones, la composición comprende un primer volumen interior que es una primera red vascular que comprende células endoteliales vasculares humanas y un segundo volumen interior que es una segunda red vascular que comprende células epiteliales pulmonares humanas, en donde la composición, cuando se conecta al sistema de circulación sanguínea de un paciente, es capaz de intercambiar gases. Por ejemplo, la composición puede usarse para suplementar o reemplazar el tejido pulmonar de un paciente. En algunas realizaciones, la composición comprende fibras elásticas que permiten la expansión y la contracción de la composición. En algunas realizaciones, la composición se implanta en el paciente. En algunas realizaciones, la composición es extracorpórea para el paciente.
- 65 En algunas realizaciones, la composición comprende un primer volumen interior que es una primera red vascular que comprende células endoteliales vasculares humanas y un segundo volumen interior que es una segunda red vascular que comprende células epiteliales pulmonares humanas, en donde la composición, cuando se conecta al sistema de circulación sanguínea de un paciente, es capaz de intercambiar gases. Por ejemplo, la composición puede usarse para suplementar o reemplazar el tejido pulmonar de un paciente. En algunas realizaciones, la composición comprende fibras elásticas que permiten la expansión y la contracción de la composición. En algunas realizaciones, la composición se implanta en el paciente. En algunas realizaciones, la composición es extracorpórea para el paciente.

En algunas realizaciones, la composición comprende un primer volumen interior que es una primera red vascular que comprende células endoteliales vasculares humanas y un segundo volumen interior que es uno o más espacios lumenales que comprenden células epiteliales intestinales humanas, y células intersticiales y células musculares fuera de los volúmenes interiores, en donde la composición es capaz de realizar peristaltismo y, cuando se conecta al sistema de circulación sanguínea de un paciente, es capaz de absorber nutrientes en la sangre del paciente. Por ejemplo, la composición puede usarse para suplementar o reemplazar una porción del tracto digestivo de un paciente.

En algunas realizaciones, la composición comprende un primer volumen interior que es una primera red vascular que comprende células endoteliales vasculares humanas y un segundo volumen interior que es una segunda red vascular que comprende células endocrinas humanas, en donde la composición, cuando se conecta al sistema de circulación sanguínea de un paciente, es capaz de difundir hormonas u otras sustancias en la sangre del paciente. Por ejemplo, la composición puede usarse para suplementar o reemplazar tejido tiroideo, paratiroideo, suprarrenal, del timo y/o pituitario de un paciente.

En algunas realizaciones, la composición es una construcción de tejido u órgano.

Algunos aspectos de la invención se dirigen a un método para elaborar una composición, que comprende: (a) generar una primera estructura de sacrificio que comprende uno o más materiales de sacrificio sobre una estructura de soporte; (b) aplicar una capa de película delgada que comprende material de membrana basal funcional que comprende material de matriz extracelular (MEC) o tejido descelularizado, que se ha licuado u homogeneizado, a la primera estructura de sacrificio, en donde la capa de película delgada tiene un espesor de  $10\ \mu\text{m}$   $\pm$  10 % o menos y en donde la primera estructura de sacrificio entra en contacto con un primer lado de la capa de película delgada; (c) aplicar un material de sacrificio a un segundo lado de la capa de película delgada para formar una segunda estructura de sacrificio e incrustar la segunda estructura de sacrificio en un material; (d) retirar el material de sacrificio para proporcionar un volumen interior que comprende un primer volumen interior y un segundo volumen interior que tiene un límite definido por la capa de película delgada, fabricando de esta manera la composición, en donde al menos uno del primer volumen interior y del segundo volumen interior forma una red de canales vasculares.

En alguna realización, el material de sacrificio tiene una propiedad de gelificación térmicamente reversible o puede someterse a un cambio de fase después de la aplicación de calor o frío. Cualquier material adecuado puede ser un material de sacrificio si puede retirarse sin necesidad de retirada, degradación y/o daño a la película delgada y/o al material permanente. En algunas realizaciones, el material de sacrificio es soluble en condiciones en donde la película delgada y/o el material permanente no son solubles. En algunas realizaciones, el material de sacrificio es digerible química o enzimáticamente en condiciones en donde la película delgada y/o el material permanente no son digeribles. En algunas realizaciones el material de sacrificio es un polímero o hidrogel.

En alguna realización, la estructura de sacrificio de la etapa (a) se genera por extrusión, moldeo, molienda o impresión aditiva. El método de generar la estructura de sacrificio no está limitado y puede emplear cualquier método adecuado en la técnica.

En algunas realizaciones, el material de sacrificio define un espacio interior (por ejemplo, espacio luminal) como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, la estructura de sacrificio tiene un volumen que define al menos un canal (por ejemplo, al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 100, 200, 500, 750, 1000, 2000, 10000 canales). En algunas realizaciones, el al menos un canal comprende una red de canales ramificados que tiene ramificaciones con diámetros decrecientes (por ejemplo, al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 100, 200, 500, 750, 1000, 2000, 10000 ramificaciones). En algunas realizaciones, los diámetros del canal pueden incluir, pero no estar limitado a, aproximadamente 10 cm, 10 mm, 5 mm, 1 mm, 500  $\mu\text{m}$ , 50  $\mu\text{m}$ , 10  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}$ , 3  $\mu\text{m}$ , 1  $\mu\text{m}$ , 0,5  $\mu\text{m}$ , 0,1  $\mu\text{m}$ , 0,05  $\mu\text{m}$ , 0,02  $\mu\text{m}$  o 0,01  $\mu\text{m}$ .

En algunas realizaciones, la estructura de sacrificio tiene un volumen que define una red de canales vasculares o espacios lumenales. En algunas realizaciones, la red de canales vasculares o espacios lumenales definen un volumen de aproximadamente 0,01 ml a aproximadamente 10 l, de aproximadamente 0,1 ml a aproximadamente 5 l, de aproximadamente 1 ml a aproximadamente 1 l, de aproximadamente 10 ml a aproximadamente 0,5 l, de aproximadamente 50 ml a aproximadamente 250 ml o de aproximadamente 75 ml a aproximadamente 150 ml o cualquier intervalo entre los mismos.

En algunas realizaciones, la red de canales o espacio luminal se define a través de estampación, moldeo u otras técnicas conocidas en la técnica que producirán un espacio negativo dentro del material del andamio o una porción del material del andamio. Este espacio se rodea o sella después mediante la adición de la membrana de película delgada (Fig. 6).

En algunas realizaciones, la red de canales o espacio luminal se definen a través de la unión selectiva de membrana o membranas de película delgada. Por ejemplo, en algunas realizaciones, pueden superponerse dos trozos de membrana de película delgada y selectivamente fundirlas, pegarlas, reticularlas o unir las de otra manera entre sí en

un patrón de tal manera que se forma un espacio interior o una red de canales entre las dos membranas (Fig. 7).

En algunas realizaciones, la estructura de soporte comprende un andamio celular. En algunas realizaciones, el andamio celular deriva de un tejido u órgano descelularizado.

5 En algunas realizaciones, la película delgada de la etapa (b) se aplica mediante deposición química o física de película delgada, atomización, pulverización, electrohilado o gelificación. Puede usarse cualquier método adecuado de deposición de película delgada y no está limitado.

10 En algunas realizaciones, la película delgada de la etapa (b) tiene un espesor de aproximadamente 0,1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 100  $\mu\text{m}$ , de aproximadamente 0,5  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 50  $\mu\text{m}$ , de aproximadamente 1,0  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 40  $\mu\text{m}$ , de aproximadamente 5,0  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 30  $\mu\text{m}$  o de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 20  $\mu\text{m}$ , o cualquier intervalo entre los mismos. En algunas realizaciones, la película delgada de la etapa (b) tiene un espesor de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  o menos. En algunas realizaciones, la película delgada de la etapa (b) tiene un espesor de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  o menos. Un espesor de solo 10  $\mu\text{m}$  +/- 10 % o menos es conforme a la invención.

20 En algunas realizaciones, la película delgada está curada, parcial o totalmente reticulada, polimerizada, seca o gelificada después de la realización de la etapa (b). Cualquier método adecuado de curado, reticulación, polimerización, secado o gelatinización puede usarse y no está limitado.

25 El material de la membrana basal funcional comprende tejido descelularizado o matriz extracelular que se ha licuado u homogeneizado. En algunas realizaciones, el material funcional de la membrana basal comprende colágeno, nitrocelulosa, gelatina, hidrogel o ácido poliláctico.

30 La construcción de la membrana basal de la etapa (e) comprende uno o más volúmenes interiores entre cada capa de película delgada. La estructura de la membrana basal comprende dos volúmenes interiores, contactando una fina capa de película ambos volúmenes interiores. Por ejemplo, en el caso de tres capas de película delgada y dos volúmenes interiores. En algunas realizaciones, la construcción de la membrana basal de la etapa (e) comprende uno o más volúmenes interiores entre capas de película delgada alternas.

35 En algunas realizaciones, la construcción de la base comprende porciones que tienen uno o más volúmenes interiores entre cada capa de película delgada y porciones que tienen uno o más volúmenes interiores entre capas de película delgada alternas. En algunas realizaciones, las construcciones de membrana basal comprenden una membrana de película delgada y una estructura de soporte con uno o más volúmenes interiores o espacios luminales entre la membrana de película delgada y la estructura de soporte.

40 En algunas realizaciones, la etapa (e) comprende además someter el material de sacrificio a un cambio de fase o desgelificación mediante la aplicación de calor antes de la eliminación del material de sacrificio.

45 En algunas realizaciones, el método comprende además una etapa (f) de poblar uno o más volúmenes interiores con uno o más tipos de células. En algunas realizaciones, el uno o más tipos celulares comprenden un tipo de célula epitelial. En algunas realizaciones, el tipo de célula epitelial se selecciona de células de la próstata, células mamarias, hepatocitos, células de los islotes pancreáticos incluyendo células beta, células epiteliales pulmonares, células renales, células de la vejiga, células epiteliales del estómago, células epiteliales del intestino grueso y delgado, células epiteliales uretrales, células epiteliales testiculares, células epiteliales del ovario, células epiteliales cervicales, células tiroideas, células paratiroideas, células suprarrenales, células del timo, células de la vesícula biliar y células de la pituitaria.

50 En algunas realizaciones, el método comprende además una etapa (g) de poblar la construcción con células exteriores a uno o más volúmenes interiores.

55 En algunas realizaciones, la construcción de membrana basal de la etapa (e) comprende un primer volumen interior que es una primera red vascular que comprende células endoteliales vasculares humanas y un segundo volumen interior que es una segunda red vascular que comprende células epiteliales renales humanas, en donde la composición, cuando se conecta al sistema de circulación sanguínea de un paciente, es capaz de realizar hemodiálisis. Por ejemplo, la composición puede usarse para suplementar o reemplazar el tejido renal de un paciente.

60 En algunas realizaciones, la construcción de membrana basal de la etapa (e) comprende un primer volumen interior que es una primera red vascular que comprende células endoteliales vasculares humanas y un segundo volumen interior que es una segunda red vascular que comprende células epiteliales pulmonares humanas, en donde la composición, cuando se conecta al sistema de circulación sanguínea de un paciente, es capaz de intercambiar gases. Por ejemplo, la composición puede usarse para suplementar o reemplazar el tejido pulmonar de un paciente.

65 En algunas realizaciones, la construcción de membrana basal de la etapa (e) comprende un primer volumen interior que es una primera red vascular que comprende células endoteliales vasculares humanas y un segundo volumen

interior que es uno o más espacios lumenales que comprenden células epiteliales intestinales humanas, y células intersticiales y células musculares fuera de los volúmenes interiores, en donde la composición es capaz de realizar peristaltismo y, cuando se conecta al sistema de circulación sanguínea de un paciente, es capaz de absorber nutrientes en la sangre del paciente. Por ejemplo, la composición puede usarse para suplementar o reemplazar una porción del tracto digestivo de un paciente.

En algunas realizaciones, la construcción de membrana basal de la etapa (e) comprende un primer volumen interior que es una primera red vascular que comprende células endoteliales vasculares humanas y un segundo volumen interior que es una segunda red vascular que comprende células endocrinas humanas, en donde la composición, cuando se conecta al sistema de circulación sanguínea de un paciente, es capaz de difundir hormonas u otras sustancias en la sangre del paciente. Por ejemplo, la composición puede usarse para suplementar o reemplazar tejido tiroideo, paratiroides, suprarrenal, del timo y/o pituitario de un paciente.

Lo anteriormente analizado y muchas otras características y ventajas concomitantes de las presentes invenciones se entenderán mejor mediante referencia a la siguiente descripción detallada de la invención.

### Breve descripción de los dibujos

Las FIG. 1A-1C representan un método basado en componentes de ensamblaje de un andamio de membrana de película delgada en el cual la membrana se crea como un componente independiente que a continuación se incorpora al andamio: A) se crea una membrana de película delgada, B) se deposita material de sacrificio sobre la membrana para formar redes de canales en uno o más lados, y C) la membrana y el componente o componentes del canal pueden estar embebidos en un material de andamio para formar la construcción del andamio.

Las FIG. 2A-2C representan un método secuencial de ensamblaje de un andamio de membrana de película delgada en el cual la membrana se deposita o se crea de otra manera sobre o en conjunto con una red o redes de canales u otros componentes del andamio: A) El material de sacrificio se deposita para formar redes de canales, B) una membrana de película delgada se deposita o se crea de otra manera junto con las redes de canales, y C) la membrana y el componente o componentes del canal se embeben en un material de andamio para formar la construcción.

Las FIG. 3A-3D representan un método alterno de ensamblaje de andamio de membrana de película delgada en el cual la membrana se deposita o se crea de otra manera sobre o en conjunto con redes de canales u otros componentes de andamio, y este proceso se repite para formar andamios más grandes o más complejos: A) una membrana de película delgada y material de sacrificio se depositan para formar red o redes de canales iniciales, B) se deposita una segunda capa de membrana de película delgada, C) se deposita una capa adicional de material de sacrificio y D) se repite el proceso para formar andamios más grandes.

Las FIG. 4A-4C representan un método de siembra celular para la construcción del andamio completado: A) se crea el andamio acelar, B) se elimina el material fugitivo formando el espacio negativo para la red o redes de canales y C) se siembran múltiples poblaciones de células en el andamio y las redes de canales.

Las FIG. 5A-5C representan un método alternativo para la celularización de la construcción de andamio: A) las células están embebidas, encapsuladas o contenidas de otra manera en los materiales usados para construir el andamio, B) a medida que el andamio se reticula, se cultiva o se estabiliza de otra manera, las células se adhieren al andamio y C) el material fugitivo se elimina de las redes de canales dejando el contenido celular recubriendo el espacio negativo.

Las FIG. 6A-6C representan un método alternativo para construir la red de canales o espacio luminal, definidos a través de estampación, moldeado u otras técnicas conocidas en la técnica que producirán un espacio negativo dentro del material del andamio o una porción del material del andamio: A) el material del andamio se moldea para crear negativos de la red o redes de canales o espacios lumenales, B) la membrana de película delgada se reticula o se une de otra manera al material del andamio creando redes de canales cerrados, y C) se moldea un segundo componente de material del andamio y se añade a la construcción para crear una segunda red de canales. Este proceso puede repetirse secuencialmente.

Las FIG. 7A-7C representan un método alternativo para construir la red de canales o espacio luminal, que se define a través de la unión selectiva de membrana o membranas de película delgada: A) Dos trozos de membrana de película delgada pueden superponerse, B) las membranas selectivamente se funden, se pegan, se reticulan o se unen de otra manera entre sí en un patrón de tal manera que se forma un espacio interior o una red de canales entre las dos membranas, C) se forma el espacio luminal en regiones que no tienen membranas unidas.

La FIG. 8 representa ejemplos de membranas de película delgada, andamios, redes de canales y arquitectura específica de órganos creadas usando estas técnicas descritas en el presente documento para la construcción de andamios de membrana de película delgada.

### Descripción detallada de la invención

En algunas realizaciones, la invención desvelada en el presente documento aborda un componente crítico necesario para diseñar construcciones de tejido orgánico funcional mediante la creación de una membrana biomimética dentro de los andamios orgánicos que pueden realizar la misma función que la membrana basal en el tejido orgánico nativo, es decir, filtración, difusión, absorción y secreción. En algunas realizaciones, la invención cubre métodos de construcción de membranas biológicas de película delgada de composición y propiedades variables que pueden

- incorporarse en andamios para ingeniería de tejidos. Estos andamios pueden tener una composición material variable y contener una o más redes de canales de arquitectura variable capaces de contener o transportar líquido, gas u otros materiales. Estos canal o canales están adyacentes o revestidos con membranas de película delgada de composición variable. En la Figura 1 se representa un concepto general de algunas realizaciones de la invención. Específicamente,
- 5 en esta realización la membrana de película delgada abarca parcial o totalmente un compartimento, canal o red de canales y otro compartimento, canal, o red de canales adyacente, define el límite entre estos dos compartimentos, canales o redes de canales. Esta arquitectura de membrana y canal comprende la parte funcional del andamio que permite filtración, difusión, absorción, excreción u otra función biológica.
- 10 En algunas realizaciones, el componente de membrana de película delgada puede fabricarse usando técnicas tales como pulverización, electrohilado, deposición de película delgada u otras técnicas conocidas en la técnica para crear una película de material biológico sobre un sustrato o superficie. En algunas realizaciones, la película delgada que compone la membrana basal en el andamio se construye como un componente separado y se retira del sustrato, después de lo cual la membrana puede manipularse aún más y posteriormente incorporarse al andamio junto con el
- 15 compartimento, canal o componente o componentes de red de canales. En algunas realizaciones, la membrana de película delgada se construye, se deposita o se creados de otra manera junto con el componente de red del canal. En algunas realizaciones, la membrana de película delgada se deposita sobre un material fugitivo de una arquitectura específica, que opcionalmente puede embeberse o incorporarse de otra manera en un andamio. En algunas realizaciones, el material fugitivo se evacúa del andamio durante o después de la construcción produciendo un
- 20 componente de membrana de película delgada con una arquitectura específica relacionada con el material fugitivo. La membrana de película delgada, la red o redes de canales y otros componentes del andamiaje pueden fabricarse sin células, las células pueden sembrarse, encapsularse o incorporarse de otra manera en el proceso de fabricación de cualquiera o todos estos componentes en cualquier momento durante o después de la fabricación de todo el andamio.
- 25 En algunas realizaciones, la membrana de película delgada puede contener poros, rendijas, rugosidad de la superficie u otras características funcionales impartidas durante la fabricación usando técnicas conocidas en la técnica diseñadas para mejorar la función, la biocompatibilidad u otras cualidades de la membrana.
- 30 El compartimento o compartimentos o la red o redes de canales contenidos dentro del andamio y adyacentes a la membrana de película delgada pueden construirse usando moldes, filamentos, extrusión, impresión tridimensional o técnicas que usan una diversidad de materiales previamente definidos incluyendo materiales fugitivos para describir el espacio del lumen, depositado en un patrón o arquitectura dados. Estos materiales pueden organizarse en patrones jerárquicos o arquitecturas que permitan patrones de flujo ramificados y una gran superficie. Estas redes de canales pueden diseñarse de una manera específica para producir o promover una función dentro del andamio. Estas redes
- 35 de canales pueden estar interconectadas o separadas.
- La fabricación del componente de membrana de película delgada puede producirse por separado, en presencia de, o en conjunción con la fabricación de otros componentes de andamios, tales como la red o redes de canales. La fabricación de la membrana de película delgada puede producirse de manera continua durante la construcción del
- 40 andamio junto con otras etapas o procesos de fabricación. El componente o componentes de membrana y el componente o componentes de red de canales pueden ensamblarse secuencialmente o de manera integral para formar un andamio completo, y pueden combinarse con otros materiales de andamio de composición similar u otra durante este proceso.
- 45 El componente de membrana de película delgada puede posteriormente reticularse, secarse, gelificarse, curarse o estabilizarse de otra manera para formar una membrana de película delgada cohesiva y mecánicamente estable. Esta película delgada puede sufrir un tratamiento o manipulación adicional para proporcionar una función o mecánica mejorada.
- 50 Los componentes de la red o redes de canales pueden construirse con material o materiales que pueden o no ser fugitivos por naturaleza y pueden disolverse, licuarse o retirarse de otra manera del andamio creando un espacio de lumen negativo que comprende el compartimento o red o redes del canal.
- 55 El material a granel dentro del andamio no abarcado por los componentes de la membrana de película delgada o la red o redes de canales puede construirse a partir de materiales biológicos, sintéticos o compuestos de composición similar o diferente a la del componente de membrana, siempre que pueda reticularse o unirse de otra manera con la membrana para formar un único andamio cohesivo.
- 60 Este andamio puede ser de una composición apropiada para que sea estable mecánica, químicamente y de otras formas, en condiciones *in vitro* e *in vivo*. Este andamio puede reticularse o alterarse de otra manera para mantener la estabilidad a temperaturas apropiadas para el cultivo de células *in vitro* y la implantación *in vivo*.
- 65 Este andamio puede construirse con células o pueden añadirse células después de la construcción. El andamio puede soportar uno o varios tipos de células en cualquier ubicación dentro del andamio, que puede o no potenciar, promover, habilitar o de otra manera, proporcionar función o funciones relacionadas con la ubicación de la célula o del andamio. El componente o componentes de membrana, el componente o componentes de la red de canales y el componente o

componentes del andamio a granel pueden incorporar células en su construcción a través de encapsulación, injerto u otros medios conocidos en la técnica. La membrana de película delgada y el andamio pueden construirse con materiales tales que permitan que la remodelación celular, la reconstrucción y el mantenimiento del andamio se produzcan. La interacción entre la célula y el andamio puede mejorar o promover las características, las cualidades o la función de la membrana de película delgada.

El andamio puede estar poblado por células que pueden proporcionar función organizada cohesiva tal como difusión, filtración, secreción y absorción junto con la membrana o membranas de película delgada, red o redes de canales y andamiaje masivo. En algunas realizaciones, esta función o funciones pueden realizarse en conjunto con o dependiendo de los contenidos de las redes de canales y pueden realizar alteraciones materiales, químicas, biológicas o de otro tipo al contenido de la red o redes de canales.

En algunas realizaciones de la invención, el andamio y la membrana están poblados por tipos de células capaces de proporcionar funciones de hemodiálisis que potencialmente incluyen pero no limitado a filtración, difusión, absorción y secreción de glucosa, electrolitos, toxinas y otras moléculas. El dispositivo de andamio y membrana de película delgada puede tener red o redes de canales perfundidas por sangre para realizar las funciones mencionadas anteriormente en esa sangre. El andamio puede tener o no redes de canales adicionales perfundidas por otros líquidos, tales como dializado, para facilitar o mejorar esta función. Las realizaciones de la invención pueden usarse de manera extracorpórea o pueden implantarse en un paciente como un injerto de hemodiálisis *in vivo* para aplicaciones terapéuticas.

En algunas realizaciones de la invención, el andamio y la membrana están poblados por tipos de células capaces de proporcionar funciones pulmonares que potencialmente incluyen pero no limitado a difusión, intercambio de gases, absorción y secreción. El dispositivo de andamio y membrana de película delgada puede tener red o redes de canales perfundidas por sangre para realizar las funciones mencionadas anteriormente en esa sangre. El andamio puede tener o no redes de canales adicionales perfundidos por otros líquidos o gases para facilitar o mejorar esta función. Las realizaciones de la invención pueden usarse de manera extracorpórea o pueden implantarse en un paciente como un dispositivo de intercambio de gases *in vivo* o injerto de tejido pulmonar para aplicaciones terapéuticas.

En algunas realizaciones de la invención, el andamio y la membrana están poblados por tipos de células capaces de proporcionar funciones intestinales que potencialmente incluyen pero no limitado a absorción y secreción. El dispositivo de andamio y membrana de película delgada puede tener red o redes de canales perfundidas por sangre para realizar las funciones mencionadas anteriormente en esa sangre. El andamio puede tener o no redes de canales adicionales perfundidos por otros líquidos o gases para facilitar o mejorar esta función. La realización de la invención puede implantarse en un paciente para que funcione como un injerto de tejido intestinal *in vivo* para aplicaciones terapéuticas.

En algunas realizaciones de las invenciones desveladas en el presente documento, el material de sacrificio puede moldearse en forma de una red de canales ramificados de complejidad creciente y diámetro decreciente. En algunas realizaciones, las ramificaciones de una red de canales posteriormente se fusionan para formar un número decreciente de ramificaciones de salida de diámetro creciente. En algunas realizaciones, las ramificaciones de una red de canales imitan patrones de perfusión naturales (por ejemplo, exhibiendo una gran cantidad de canales con una gran superficie para difusión dentro de construcciones de tejido que pueden ser perfundidas desde una sola fuente, permitiendo una arquitectura de canal funcional en conjunción con la membrana basal de película delgada). Los métodos desvelados en el presente documento permiten múltiples redes, canales, capas de redes u otra geometría y arquitectura que pueden combinarse en tamaño y función para formar estructuras de tejido de tamaño y sofisticación crecientes.

En algunas realizaciones de las invenciones desveladas en el presente documento, el diámetro del canal está determinado por el método de dispensación, las propiedades del material y/u otros parámetros. El diámetro del canal puede ser cualquier diámetro adecuado. En algunas realizaciones, los diámetros de canal (por ejemplo, los diámetros de canal en tejidos impresos o andamios) pueden incluir, pero no estar limitado a, aproximadamente 10 cm, 10 mm, 5 mm, 1 mm, 500  $\mu\text{m}$ , 50  $\mu\text{m}$ , 10  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}$ , 3  $\mu\text{m}$ , 1  $\mu\text{m}$ , 0,5  $\mu\text{m}$ , 0,1  $\mu\text{m}$ , 0,05  $\mu\text{m}$ , 0,02  $\mu\text{m}$  o 0,01  $\mu\text{m}$ . Los avances significativos en técnicas de micro y nanofabricación, tales como las impresoras de polimerización de dos fotones pueden permitir el diseño y la construcción de componentes de material de sacrificio o estructuras de hidrogel y polímero con una arquitectura con una resolución de 0,01-10  $\mu\text{m}$ .

Algunas realizaciones de las invenciones desveladas en el presente documento incluyen tejidos o construcciones biológicas que consisten en un material de sacrificio con gelificación térmicamente reversible (tales como gel Pluronic F127 (nombre genérico poloxámero 407)) y componentes de andamiaje y membrana basal de película delgada que consisten en materiales que incluyen, pero no limitado a, gelatina, colágeno, quitosano, celulosa, PLA u otros polímeros o materiales biológicos o materiales compuestos que puedan ensamblarse y reticularse como se describe en los ejemplos anteriores.

Algunas realizaciones de las invenciones divulgadas en el presente documento incluyen la fabricación de tejidos o construcciones biológicas que consisten en un material de sacrificio y componentes de membrana basal y andamiaje que consisten en hidrogeles tales como gelatina, PLA, quitosano, compuestos de hidrogeles u otros materiales de



hidrogel y compuestos de diversas concentraciones y composiciones. En algunas realizaciones, la variación de los materiales de hidrogel y los compuestos de diversas concentraciones y composiciones permite ajustar las propiedades mecánicas y biológicas que pueden mejorar y especializar aún más las construcciones de tejidos para las aplicaciones biológicas deseadas.

Algunas realizaciones de las invenciones divulgadas en el presente documento incluyen tejidos o construcciones biológicas y métodos para la fabricación de los mismos, que contienen hidrogeles, polímeros y compuestos de materiales que se han modificado mediante técnicas tales como eliminación de iones metálicos divalentes, unión de ligando u otras técnicas conocidas en la técnica para producir propiedades mecánicas y biológicas ajustables.

Algunas realizaciones de las invenciones divulgadas en el presente documento incluyen tejidos o construcciones biológicas y métodos para la fabricación de los mismos, que contienen hidrogeles, polímeros y compuestos de materiales que se han modificado mediante la adición de agentes o compuestos mejoradores para producir propiedades mecánicas y biológicas ajustables. Algunos ejemplos de técnicas incluyen, pero no se limitan a, la adición de glicerina, sorbitol, propilenglicol u otros plastificantes en gelatina o hidrogeles compuestos de gelatina.

Algunas realizaciones de las invenciones divulgadas en el presente documento incluyen tejidos o construcciones biológicas y métodos para la fabricación de los mismos, con la inclusión de material o materiales adicionales tales como polímero o material de hidrogel que proporcionan una matriz de soporte para el material y la construcción de la membrana basal. Estos material o materiales adicionales tales como polímero o hidrogel pueden estar contruidos con un material similar al de la membrana basal o pueden estar contruidos con un hidrogel o polímero complementario.

Algunas realizaciones de las invenciones divulgadas en el presente documento incluyen tejidos o construcciones biológicas y métodos para la fabricación de los mismos, en donde el componente o componentes de la membrana basal y/o el componente o componentes del andamio están contruidos con gelatina u otro hidrogel o material biocompatible que se ha alterado para ser fotocurable usando luz ultravioleta de diversas longitudes de onda, tal como metacrilato de gelatina. Los materiales tales como este, en concentraciones variables, pueden crearse usando protocolos publicados o técnicas conocidas en la técnica.

Algunas realizaciones de las invenciones divulgadas en el presente documento incluyen tejidos o construcciones biológicas y métodos para la fabricación de los mismos, en donde el componente o componentes de la membrana basal y/o el componente o componentes del andamio se aplican en un proceso multietapa. Este proceso puede consistir en la aplicación de una capa de hidrogel o material polimérico sobre el material de sacrificio, ya sea antes o después de la aplicación de una solución o compuesto de curado que actúa para polimerizar, gelificar, curar o solidificar de otra manera el material polimérico o de hidrogel. En algunas realizaciones, la aplicación de gelatina y la posterior aplicación de una solución de reticulación (por ejemplo, una solución que comprende glutaraldehído, transglutaminasa u otras enzimas o moléculas de reticulación) en, pero no limitado a, una concentración de aproximadamente 0,01-5 g por 10 g de gelatina.

Algunas realizaciones de las invenciones divulgadas en el presente documento incluyen tejidos o construcciones biológicas y métodos para la fabricación de los mismos, en donde la solución de curado para el material de la membrana basal está contenida dentro del material de sacrificio y el material de la membrana basal está curado, gelificado o solidificado de otra manera al entrar en contacto con el material de sacrificio. Este método se aplica al material de la membrana basal que está atomizado, pulverizado, depositado o aplicado de otra manera al material del sacrificio, así como al material de sacrificio que está imprimido, extruido o expuesto de otra manera al material de la membrana basal por inmersión.

Algunas realizaciones de las invenciones divulgadas en el presente documento incluyen tejidos o construcciones biológicas y métodos para la fabricación de los mismos, en donde cualquiera o todos los materiales de hidrogel o polímero usados en la construcción del tejido o construcción pueden contener células en suspensión, adheridas o encapsuladas de otra manera para sembrar o suministrar una fuente de células para la construcción de tejido.

Algunas realizaciones de las invenciones divulgadas en el presente documento incluyen tejidos o construcciones biológicas y métodos para la fabricación de los mismos, que contienen hidrogeles y polímeros con la encapsulación o adición de factores biológicos para promover el crecimiento de células y tejidos.

Algunas realizaciones de las invenciones divulgadas en el presente documento incluyen tejidos o construcciones biológicas y métodos para la fabricación de los mismos, en donde la membrana basal se fabrica junto con un sustrato que imparte un patrón, porosidad u otra condición física sobre la membrana con el fin de mejorar la función o la biocompatibilidad u otras cualidades.

Algunas realizaciones de las invenciones divulgadas en el presente documento incluyen tejidos o construcciones biológicas y métodos para la fabricación de los mismos, en donde la membrana basal se fabrica junto con un sustrato o material o materiales que mejoran la membrana a través de medios biológicos o químicos, tal como la adición de factores de crecimiento, ligandos, células encapsuladas u otros componentes biológica o bioquímicamente relevantes.

Algunas realizaciones de las invenciones divulgadas en el presente documento comprenden dispositivos de andamio o de membrana de película delgada y métodos para la fabricación de los mismos, que tienen red o redes de canales perfundidas por sangre para realizar funciones relacionadas con esa sangre (por ejemplo, filtración; difusión; absorción; secreción de glucosa, electrolitos, toxinas u otras moléculas; intercambiador de gases; absorción; y secreción). En algunas realizaciones, estos dispositivos de andamio o de membrana de película delgada tienen redes de canales adicionales perfundidos por otros líquidos o gases para facilitar o mejorar las funciones relacionadas con esa sangre. En algunas realizaciones, los dispositivos de andamio o de membrana de película delgada proporcionan una función de manera extracorpórea o *in vivo* a un paciente para aplicaciones terapéuticas.

Algunas realizaciones de las invenciones divulgadas en el presente documento incluyen andamios y membranas, y métodos para la fabricación de los mismos, que están poblados con tipos de células capaces de proporcionar funciones de hemodiálisis (por ejemplo, filtración, difusión, absorción y/o secreción de glucosa, electrolitos, toxinas y otras moléculas). En algunas realizaciones, el andamio o membrana se usa de manera extracorpórea. En algunas realizaciones, el andamio o membrana se implanta en un paciente como un injerto de hemodiálisis *in vivo* para aplicaciones terapéuticas.

Algunas realizaciones de las invenciones divulgadas en el presente documento incluyen andamios y membranas, y métodos para la fabricación de los mismos, que están poblados con tipos de células capaces de proporcionar funciones pulmonares (por ejemplo, difusión, intercambio de gases, absorción y/o secreción). En algunas realizaciones, el andamio o membrana se usa de manera extracorpórea. En algunas realizaciones, el andamio o membrana se implanta en un paciente como un dispositivo de intercambio de gases *in vivo* o un injerto de tejido pulmonar para aplicaciones terapéuticas.

Algunas realizaciones de las invenciones divulgadas en el presente documento incluyen andamios y membranas, y métodos para la fabricación de los mismos, que están poblados con tipos de células capaces de proporcionar funciones intestinales (por ejemplo, absorción y/o secreción). En algunas realizaciones, el andamio o membrana se usa de manera extracorpórea. En algunas realizaciones, el andamio o membrana se implanta en un paciente para funcionar como un injerto de tejido intestinal *in vivo* para aplicaciones terapéuticas.

Un experto en la materia apreciará fácilmente que la presente invención está bien adaptada para llevar a cabo los objetos y obtener los fines y ventajas mencionados, así como aquellos inherentes a la misma. Los detalles de la descripción y los ejemplos incluidos en el presente documento son representativos de determinadas realizaciones, son ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención. A los expertos en la materia se les ocurrirán modificaciones y otros usos. Estas modificaciones quedan comprendidas dentro del espíritu de la invención. Será fácilmente evidente para una persona experta en la materia que pueden realizarse diversas sustituciones y modificaciones a la invención descrita en el presente documento sin alejarse del alcance y espíritu de la invención.

Los artículos "un" y "una" como se usan en el presente documento en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, salvo que se indique claramente lo contrario, deben entenderse que incluyen los referentes plurales. Las reivindicaciones o descripciones que incluyen "o" entre uno o más miembros de un grupo se consideran satisfechas si uno, más de uno, o todos los miembros del grupo están presentes en, se emplean en o son de otra manera relevantes para un producto o proceso determinado a menos que se indique lo contrario o sea evidente del contexto. La invención incluye realizaciones en las cuales exactamente un miembro del grupo está presente en, se emplea en o es de otra manera relevante para, un producto o proceso determinado. La invención también incluye realizaciones en las cuales más de uno, o todos los miembros del grupo están presentes en, se emplea en o es de otra manera relevante para, un producto o proceso determinado. Adicionalmente, debe entenderse que la invención proporciona todas las variaciones, combinaciones y permutaciones en las cuales se incluyen una o más limitaciones, elementos, cláusulas, términos descriptivos, etc., de una o más de las reivindicaciones enumeradas se introduce en otra reivindicación que depende de la misma reivindicación base (o, según sea relevante, cualquier otra reivindicación) a menos que se indique lo contrario o a menos que sea evidente para una persona con conocimientos ordinarios en la materia que surgiría una contradicción o inconsistencia. Se contempla que todas las realizaciones descritas en el presente documento son aplicables a todos los diferentes aspectos de la invención cuando sea apropiado. También se contempla que cualquiera de las realizaciones o aspectos se pueda combinar libremente con una o más de dichas realizaciones o aspectos cuando sea apropiado. Cuando los elementos se presentan como listas, por ejemplo, en grupo Markush o formato similar, debe entenderse que también se desvela cada subgrupo de los elementos y que puede eliminarse cualquier elemento o elementos. Debe entenderse que, en general, donde la invención, o los aspectos de la invención, se refiere o se refieren a que comprenden elementos particulares, características, etc., determinadas realizaciones de la invención o aspectos de la invención consisten, o consisten esencialmente en, tales elementos, características, etc. Por fines de simplicidad aquellas realizaciones no se han expuesto específicamente en cada caso en tantas palabras en el presente documento. También debe entenderse que cualquier realización o aspecto de la invención puede excluirse explícitamente de las reivindicaciones, independientemente de si la exclusión específica se menciona en la memoria descriptiva. Por ejemplo, uno cualquiera o más principios activos, aditivos, ingredientes, agentes opcionales, tipos de organismos, trastornos, sujetos o combinaciones de los mismos, pueden excluirse.

Cuando las reivindicaciones o la descripción se refieran a una composición de materia, debe entenderse que los métodos para elaborar o usar la composición de materia de acuerdo con cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento, y los métodos para usar la composición de materia para cualquiera de los fines desvelados en el presente documento son aspectos de la invención, a menos que se indique lo contrario o a menos que sea evidente para una persona con conocimientos ordinarios en la materia que surgiría una contradicción o inconsistencia. Cuando las reivindicaciones o la descripción se refieran a un método, por ejemplo, debe entenderse que los métodos para elaborar composiciones útiles para realizar el método y los productos producidos de acuerdo con el método, son aspectos de la invención, a menos que se indique lo contrario o a menos que sea evidente para una persona con conocimientos ordinarios en la materia que surgiría una contradicción o inconsistencia.

Cuando se dan intervalos en el presente documento, la invención incluye realizaciones en las cuales se incluyen los puntos finales, realizaciones en las cuales se excluyen ambos puntos finales y realizaciones en las cuales se incluye un punto final y se excluye el otro. Debe asumirse que ambos puntos finales están incluidos a menos que se indique lo contrario. Adicionalmente, debe entenderse que, a no ser que se indique lo contrario o que sea evidente a partir del contexto y del conocimiento del experto hábil en la materia, los valores que se expresan como intervalos pueden asumir cualquier valor o subintervalo específico dentro de los intervalos establecidos en diferentes realizaciones de la invención, hasta el décimo de la unidad del límite inferior del intervalo, a no ser que el contexto indique claramente lo contrario. También se entiende que cuando en el presente documento se establece una serie de valores numéricos, la invención incluye realizaciones que se refieren análogamente con cualquier valor o intervalo intermedio definido por cualesquiera dos valores en la serie, y que el valor más bajo puede tomarse como mínimo y el valor más grande puede tomarse como máximo. Los valores numéricos, como se usan en el presente documento, incluye valores expresados como porcentajes. Para cualquier realización de la invención en la que un valor numérico esté precedido por "aproximadamente" o "de forma aproximada", la invención incluye una realización en la cual se recita el valor exacto. Para cualquier realización de la invención en la que un valor numérico no esté precedido por "aproximadamente" o "de forma aproximada", la invención incluye una realización en la cual el valor está precedido por "aproximadamente" o "de forma aproximada".

Como se usa en el presente documento "A y/o B", donde A y B son términos de reivindicación diferentes, generalmente significa al menos uno de A, B, o tanto A como B. Por ejemplo, una secuencia que es complementaria y/o se hibrida con otra secuencia incluye (i) una secuencia que es complementaria a la otra secuencia aunque la primera no necesariamente se hibride con la segunda en todas las condiciones, (ii) una secuencia que se hibrida con la otra secuencia incluso si una secuencia no es perfectamente complementaria a la otra secuencia, y (iii) secuencias que son tanto complementarias a como se hibridan con la otra secuencia.

"De forma aproximada" o "aproximadamente" generalmente incluye números que caen dentro de un intervalo del 1 % o en algunas realizaciones dentro de un intervalo del 5 % de un número o en algunas realizaciones dentro de un intervalo del 10 % de un número en cualquier dirección (mayor que o menor que el número) a menos que se indique lo contrario o sea evidente a partir del contexto (excepto cuando dicho número exceda inadmisiblemente el 100 % de un valor posible). Debe entenderse que, salvo que se indique claramente lo contrario, en cualquier método reivindicado en el presente documento que incluya más de un acto, el orden de los actos del método no se limita necesariamente al orden en que se recitan los actos del método, pero la invención incluye realizaciones en las que el orden está tan limitado. También debe entenderse que, a menos que se indique lo contrario o sea evidente a partir del contexto, cualquier producto o composición descrito en el presente documento puede considerarse "aislado".

Como se usa en el presente documento el término o la expresión "que comprende" o "comprende" se usa en referencia a composiciones, métodos y componente o componentes respectivos de los mismos, que son esenciales para la invención, aún abierto a la inclusión de elementos no especificados, ya sean esenciales o no.

Como se usa en el presente documento la expresión "que consiste esencialmente en" se refiere a aquellos elementos necesarios para una realización determinada. La expresión permite la presencia de elementos adicionales que no afectan materialmente la característica o características básicas y novedosas o funcionales de esa realización de la invención.

La expresión "que consiste en" se refiere a composiciones, métodos y componentes respectivos de los mismos como se describe en el presente documento, que son excluyentes de cualquier elemento no recitado en esa descripción de la realización.

**EJEMPLOS** (Ambos ejemplos incluyen etapas del método con un solo o ningún material de sacrificio, que no son de acuerdo con la invención).

## **EJEMPLO 1**

En una realización de esta invención, un andamio de membrana basal de película delgada se ensambla como sigue:

En la etapa 1, una película delgada de un material de membrana basal biocompatible o una combinación de dichos materiales de membrana basal se deposita sobre un sustrato usando técnicas conocidas en la técnica tales como

deposición de película delgada usando métodos físicos o químicos. Esta membrana a continuación se cura, se seca, se reticula parcial o totalmente o se solidifica de otra manera y se retira del sustrato para formar un componente de membrana de película delgada uniforme.

En la etapa 2, un cianotipo de una o más redes de canales construidas con uno o varios materiales de sacrificio y depositadas sobre la superficie o superficies del componente de membrana de película delgada, forman un componente que contiene una membrana de película delgada y red o redes de canal. Esto puede lograrse usando técnicas conocidas en la técnica que incluyen pero no se limitan a extrusión, moldeo, molienda o impresión aditiva. Si es necesario, puede usarse un material de soporte mecánico, que puede o no ser también un material de sacrificio.

En la etapa 3, uno o varios componentes de membrana y canal de película delgada pueden embeberse en un material de sacrificio o en un material de matriz permanente que puede estar reticulado permanentemente al componente de membrana de película delgada. El material puede contener o no células y puede usarse para modificar propiedades mecánicas de la construcción tales como elasticidad, resistencia a la tracción y color. El material también puede proporcionar una función mecánica o biológica adicional para apoyar o mejorar la función de la construcción inicial.

En la etapa 4, el material o materiales del canal de sacrificio se retiran, dejando una o varias redes de canales y/o espacios revestidos por una membrana de película delgada con o sin estructura de soporte detrás.

En la etapa 5, la red o redes de canales, el compartimento y/o los espacios del lumen pueden repoblarse con uno o varios tipos de células epiteliales y/o endoteliales.

## EJEMPLO 2

En otro ejemplo de esta invención, un andamio de membrana basal de película delgada se ensambla como sigue:

En la etapa 1, un componente que contiene una o más redes de canales se genera a partir de uno o varios materiales de sacrificio. Esto puede lograrse usando técnicas conocidas en la técnica que incluyen pero no se limitan a extrusión, moldeo, molienda o impresión aditiva. Si es necesario, puede usarse un material de soporte mecánico o un material de andamiaje, que puede o no ser también un material de sacrificio.

En la etapa 2, este componente se recubre a continuación parcial o totalmente con una película delgada de un material de membrana basal biocompatible o una combinación de dichos materiales de membrana basal usando técnicas conocidas en la técnica tales como deposición de película delgada usando métodos físicos o químicos.

Las etapas 1 y 2 pueden lograrse mediante una técnica de deposición por capas (deposición alternada de material de sacrificio seguido de una película delgada seguida de material de sacrificio, etc.) o de forma secuencial (material o materiales de sacrificio seguidos de deposición de una película delgada).

En la etapa 3 la construcción resultante puede embeberse en un material de sacrificio o en un material de matriz permanente que puede estar reticulado permanentemente al componente de membrana. La construcción resultante puede incorporar una o múltiples construcciones de membrana de película delgada y canal. El material permanente puede contener o no células y puede usarse para modificar propiedades mecánicas de la construcción tales como elasticidad, resistencia a la tracción y color. El material también puede proporcionar una función mecánica o biológica adicional para apoyar o mejorar la función de la construcción inicial.

En la etapa 4, el material o materiales de sacrificio se retiran, dejando una o varias redes de canales y/o espacios revestidos por una membrana basal delgada con o sin estructura de soporte detrás.

En la etapa 5, la red o redes de canales y/o los espacios del lumen pueden repoblarse con uno o varios tipos de células epiteliales y/o endoteliales.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una película delgada que tiene un espesor de  $10\ \mu\text{m} \pm 10\%$  o menos, en donde

la película delgada comprende material de membrana basal funcional que comprende material de matriz extracelular (MEC) o tejido descelularizado, que se ha licuado u homogeneizado;  
la película delgada define un volumen interior y un límite entre un primer volumen interior y un segundo volumen interior; y  
la película delgada es capaz de realizar filtración de fluidos, difusión de gases, secreción o absorción de un electrolito, difusión de una hormona o combinaciones de las mismas, y en donde al menos uno del primer volumen interior y el segundo volumen interior forma una red de canales vasculares.

2. La composición de la reivindicación 1, en donde la película delgada tiene un espesor de  $1\ \mu\text{m} \pm 10\%$  o menos.

3. La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la red de canales vasculares tiene un volumen de  $0,01\ \text{ml} \pm 10\%$  a  $10\ \text{l} \pm 10\%$ .

4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el volumen interior está conectado a un espacio exterior.

5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende además uno o más tipos celulares en el volumen interior y adheridos a una superficie de la película delgada.

6. La composición de la reivindicación 5, en donde las células comprenden células epiteliales o células madre.

7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el primer volumen interior comprende

(a) una primera red vascular que comprende células endoteliales vasculares humanas y el segundo volumen interior comprende una segunda red vascular que comprende células epiteliales renales humanas, en donde la composición, cuando se conecta al sistema de circulación sanguínea de un paciente, es capaz de realizar hemodiálisis; o

(b) una primera red vascular que comprende células endoteliales vasculares humanas y el segundo volumen interior comprende una segunda red vascular que comprende células epiteliales pulmonares humanas, en donde la composición, cuando se conecta al sistema de circulación sanguínea de un paciente, es capaz de intercambiar gases; o

(c) una primera red vascular que comprende células endoteliales vasculares humanas y el segundo volumen interior comprende uno o más espacios lumenales que comprenden células epiteliales intestinales humanas, en donde la composición comprende además células intersticiales y células musculares fuera del primer y el segundo volúmenes interiores, en donde la composición es capaz de realizar peristaltismo y, cuando se conecta al sistema de circulación sanguínea de un paciente, es capaz de absorber nutrientes en la sangre del paciente; o

(d) una primera red vascular que comprende células endoteliales vasculares humanas y el segundo volumen interior comprende una segunda red vascular que comprende células endocrinas humanas, en donde la composición, cuando se conecta al sistema de circulación sanguínea de un paciente, es capaz de difundir hormonas u otras sustancias en la sangre del paciente.

8. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la composición es una construcción de tejido u órgano.

9. Un método para producir una composición, que comprende:

a. generar una primera estructura de sacrificio que comprende uno o más materiales de sacrificio sobre una estructura de soporte;

b. aplicar una capa de película delgada que comprende material de membrana basal funcional que comprende material de matriz extracelular (MEC) o tejido descelularizado, que se ha licuado u homogeneizado, a la primera estructura de sacrificio, en donde la capa de película delgada tiene un espesor de  $10\ \mu\text{m} \pm 10\%$  o menos y en donde la primera estructura de sacrificio entra en contacto con un primer lado de la capa de película delgada;

c. aplicar un material de sacrificio a un segundo lado de la capa de película delgada para formar una segunda estructura de sacrificio e incrustar la segunda estructura de sacrificio en un material;

d. retirar el material de sacrificio para proporcionar un volumen interior que comprende un primer volumen interior y un segundo volumen interior que tiene un límite definido por la capa de película delgada, produciendo de este modo la composición,

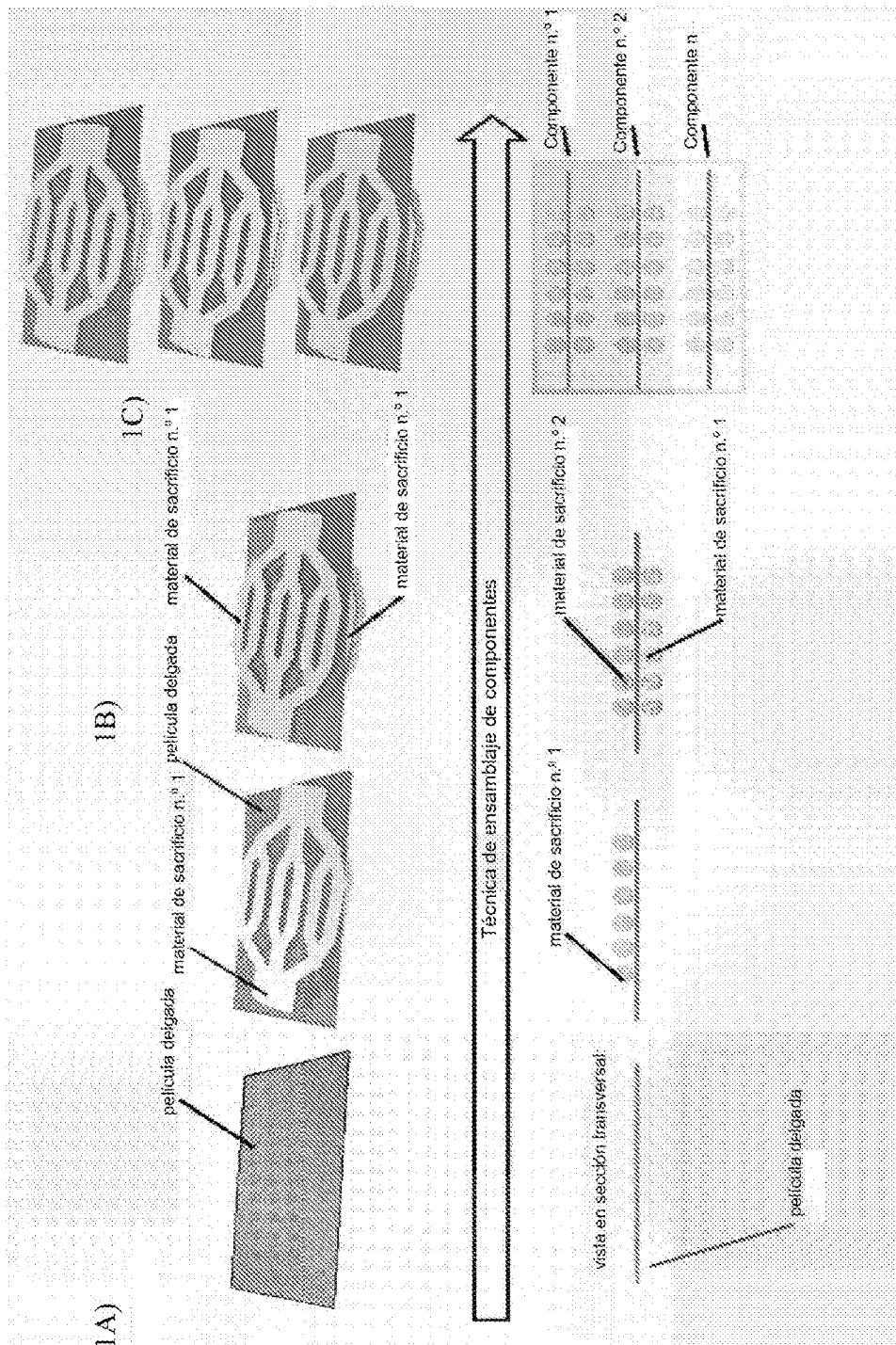
en donde al menos uno del primer volumen interior y del segundo volumen interior forma una red de canales vasculares.

10. El método de la reivindicación 9, en donde el volumen interior está conectado a un espacio exterior.

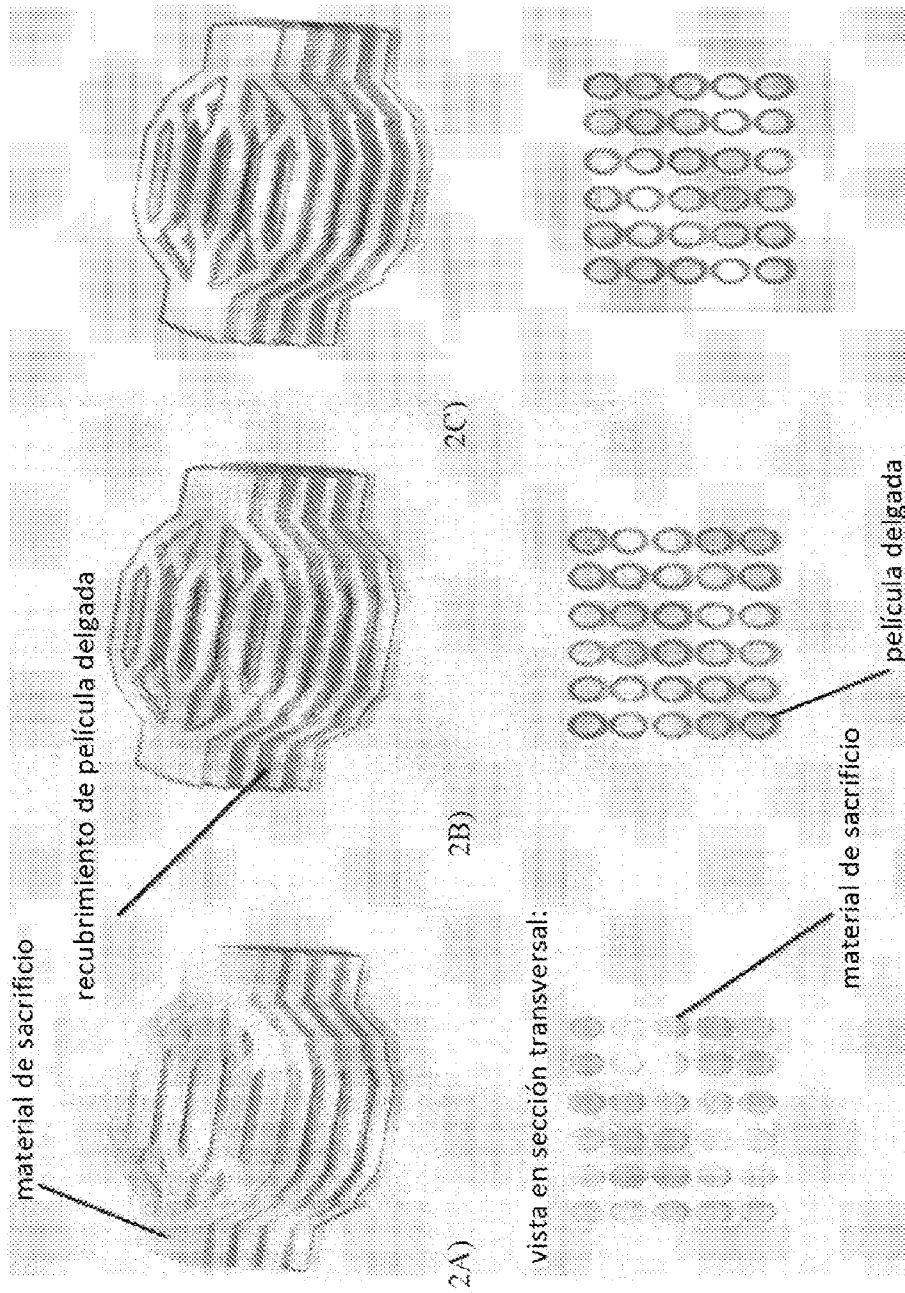
11. El método de la reivindicación 9 o la reivindicación 10, que comprende además una etapa (e) de poblar al menos uno del primer volumen interior y del segundo volumen interior con células de uno o más tipos celulares.

5 12. El método de la reivindicación 11, en donde las células comprenden células epiteliales.

13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 9-12, en donde la composición es una construcción de tejido u órgano.

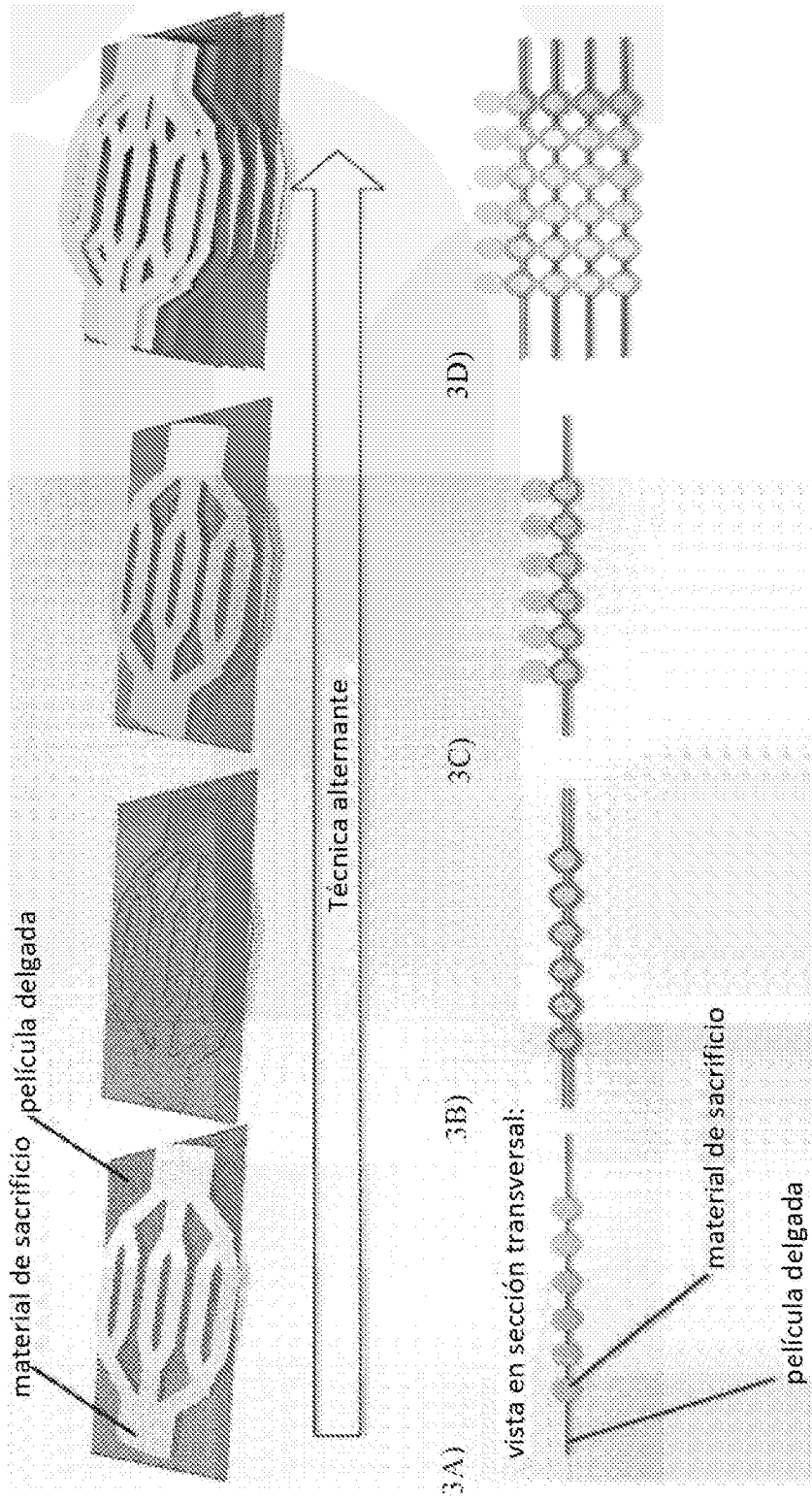


FIGS. 1A-1C

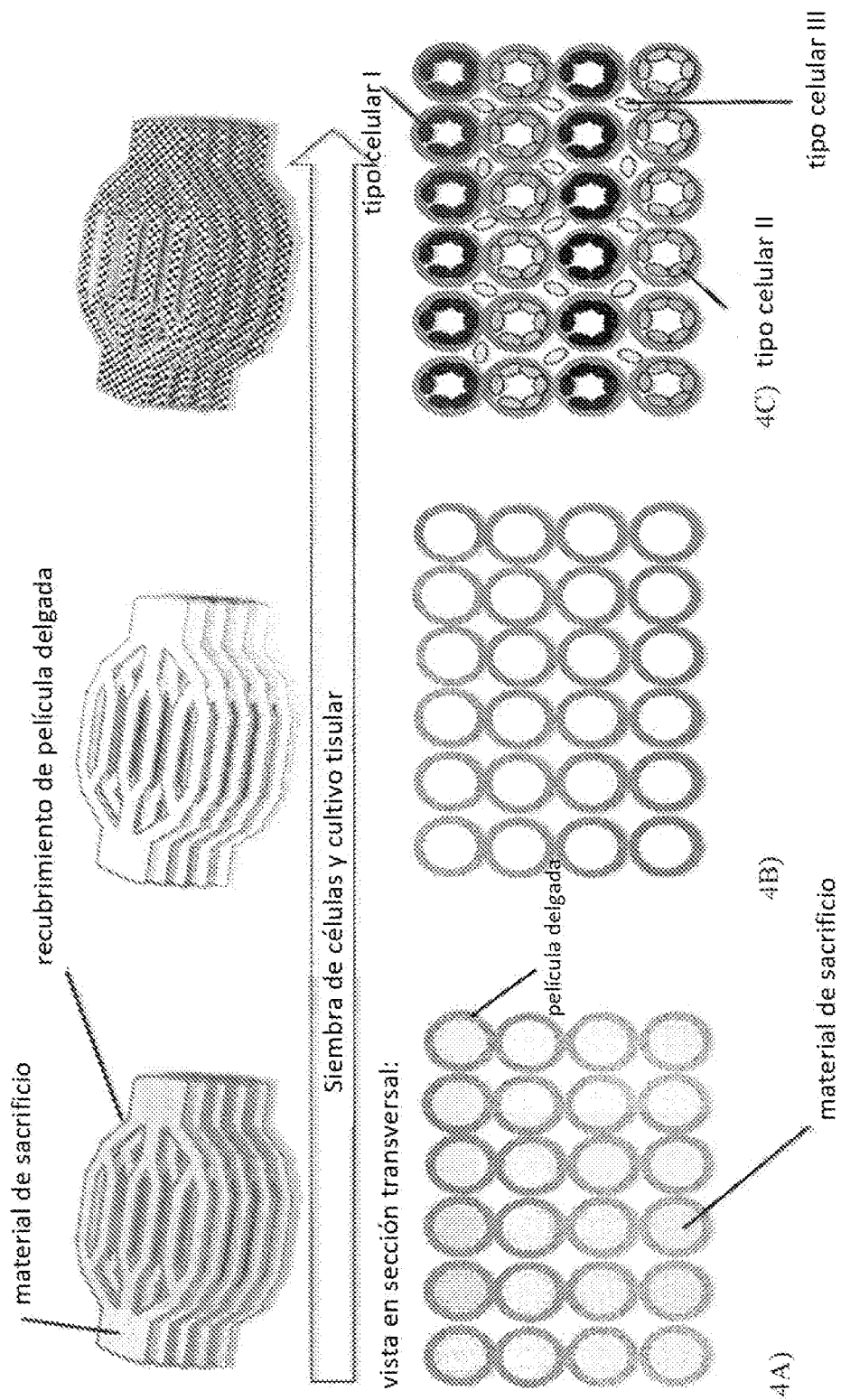


FIGS. 2A-2C





FIGS. 3A-3D



FIGS. 4A-4C

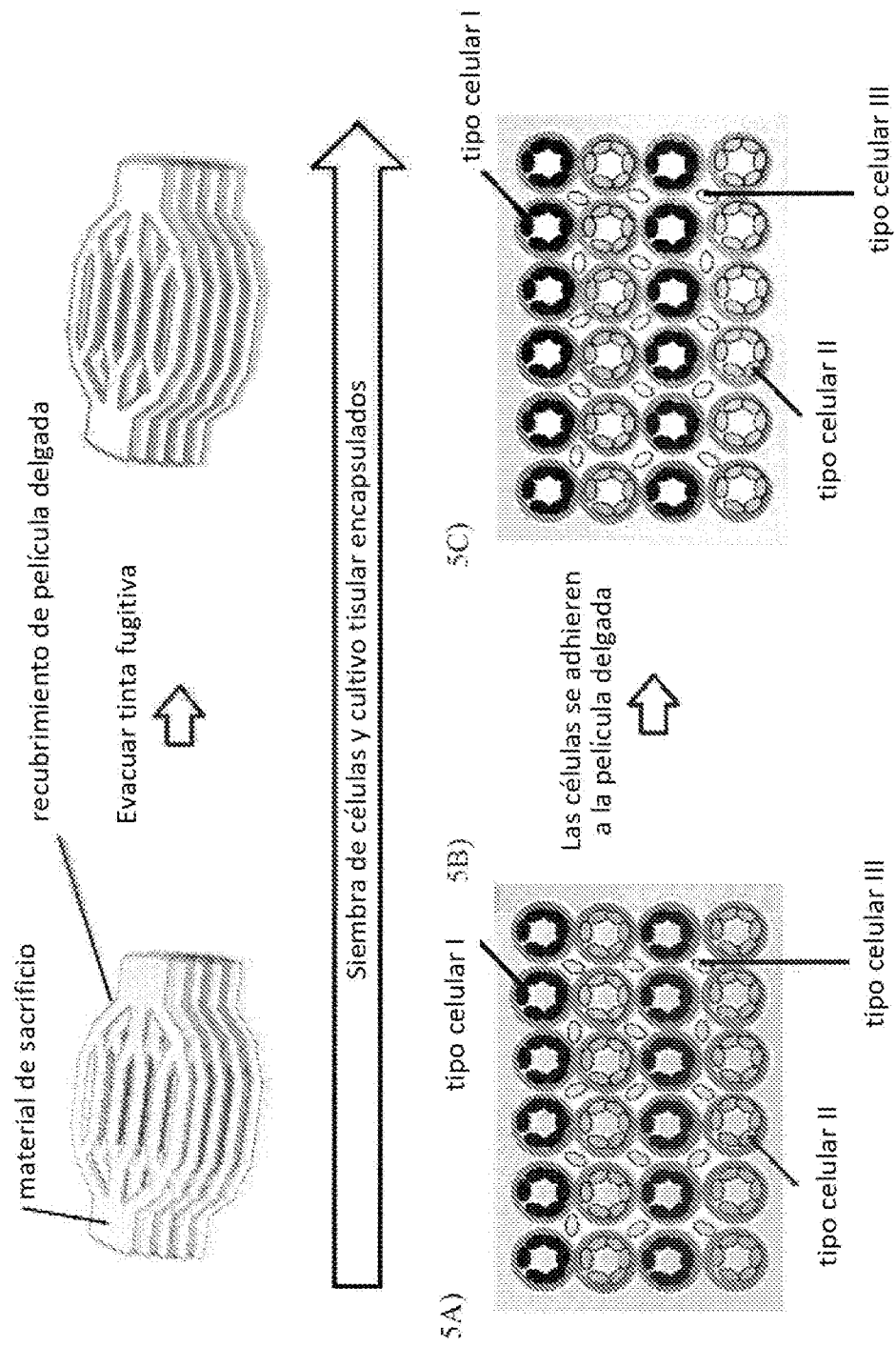


FIG. 5A-5C

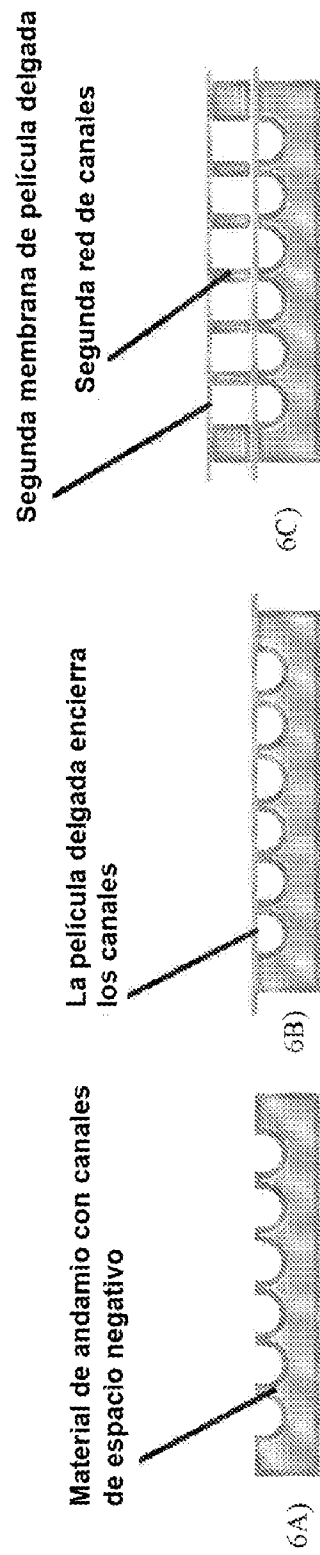


FIG. 6A-6C

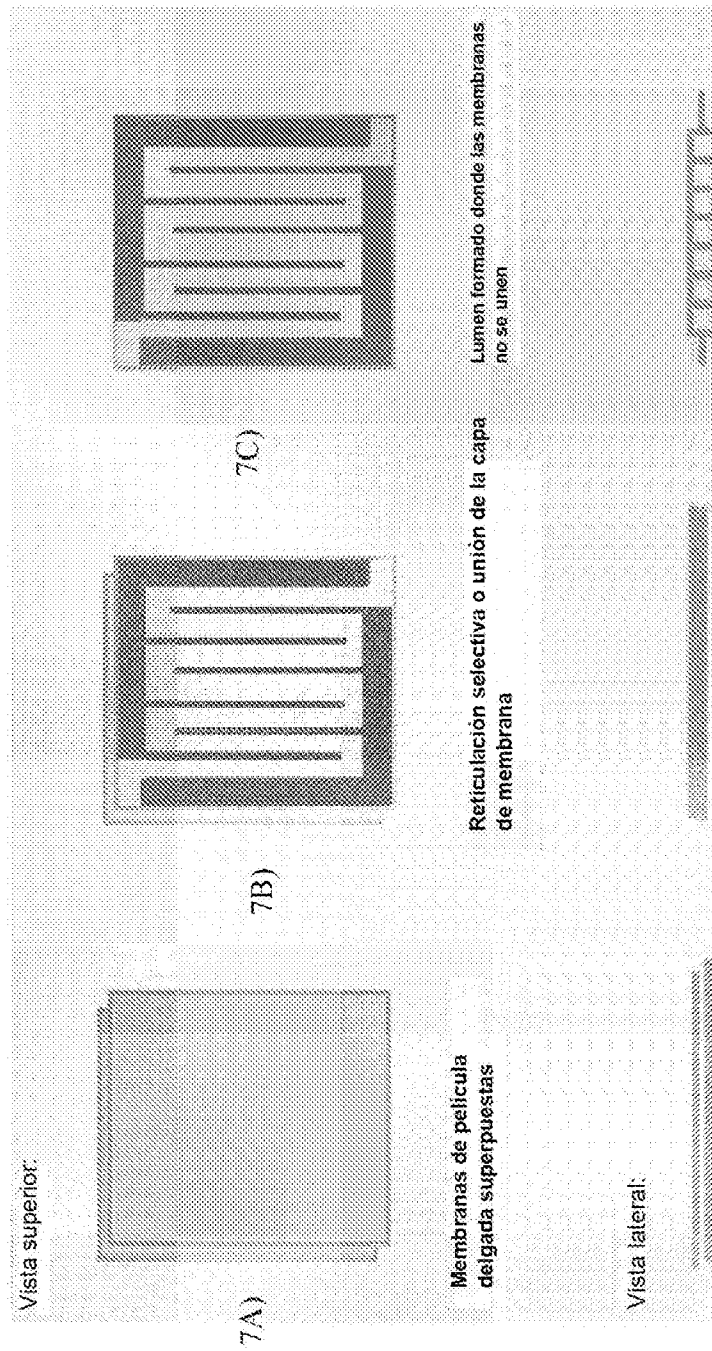


FIG. 7A-7C



FIG. 8