



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 348 095**

(51) Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **05817936 .7**

(96) Fecha de presentación : **08.12.2005**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1836489**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **26.09.2007**

(54) Título: **Procedimiento para ensayar sustancias en biomatrices.**

(30) Prioridad: **08.12.2004 DE 10 2004 059 169**

(73) Titular/es: **Hac Biomed GmbH**
Arnulfstrasse 197
80634 München, DE

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.11.2010

(72) Inventor/es: **Gorne, Martin y**
Kaufmann, Peter-Matthias

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.11.2010

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 348 095 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

La invención se refiere a un procedimiento para ensayar sustancias en biomatrices. Las biomatrices representan equivalentes de tejidos, es decir, células de tejido sobre matrices porosas, las que se basan en polímeros o mezclas de polímeros biocompatibles. Otro objeto de la presente invención es por lo tanto el uso de los equivalentes de tejidos para ensayar sustancias. También se describen un procedimiento para la preparación de matrices porosas y las matrices que se obtienen de acuerdo con este procedimiento, un procedimiento especial para la obtención de células para la inoculación de las matrices y la preparación de los equivalentes de tejido.

La ingeniería de tejidos es un campo interdisciplinario que comunica a las ciencias de la ingeniería y las ciencias de los materiales con la medicina. El objetivo es reparar tejido dañado o mejorar su función.

El principio de la ingeniería de tejidos es muy sencillo: primero se proveen células, por ejemplo, se retiran algunas células de un organismo y se reproducen *in vitro*. Las células reproducidas pueden ser incorporadas luego en una sustancia armazón, por medio de lo cual se obtiene un equivalente de tejido vivo, completo.

De especial importancia para la capacidad funcional de los equivalentes de tejido son el tipo y la estructura de la sustancia armazón utilizada, denominada a continuación también matriz. Aparte del material a utilizar, a saber, en general polímeros que se pueden degradar biológicamente, tienen un rol decisivo el tamaño de los poros, la porosidad y la superficie, como así también la forma de los poros, la morfología de la pared de los poros y la conectividad entre los poros, para el desarrollo ulterior de las células incorporadas en la sustancia armazón y finalmente para la formación tridimensional de los equivalentes del tejido. Se investigaron, por ejemplo, matrices tridimensionales con respecto a una utilización para el transplante de células hepáticas (Kaufmann, P.M. et al. (1999), *Transplantation* 68(2), págs. 272–279).

Ya se conocen procedimientos para la producción de biomatrices de este tipo. Se utilizaron para ello técnicas del campo textil, para fabricar biomatrices fibrosas tipo tejido y también tipo vellón. Otro procedimiento usual, en el cual se incorporan en el polímero biodegradable primero cristales de sal y a continuación se retiran nuevamente, posibilita controlar el tamaño de los poros por medio del tamaño de las partículas de sal y la porosidad por medio de la relación sal/polímero (WO 98/44027; Hou Q. et al. (2003), *Biomaterials* 24, págs. 1937–47; Harris L. D. et al. (1998), *J. Biomed. Mater. Res.* 42, págs. 396–403). En una modificación del procedimiento, los polímeros biodegradables, disueltos en un disolvente, se aplican sobre un así llamado material porogénico, el cual a continuación se retira nuevamente del material ligante, quedando de este modo poros con la forma de la imagen negativa del

material porogénico mencionado (WO 01/87575 A2). También se conocen matrices recubiertas, así como también matrices a base de un hidrogel liofilizado (ver, por ejemplo, WO 99/09149 A1 y US 2004/0063206 A1).

La prueba con respecto a si una determinada sustancia es tóxica para el cuerpo animal, humano o no humano, es un paso decisivo para el desarrollo de un medicamento para el campo de la medicina humana y veterinaria. Fundamentalmente es deseable reconocer una toxicidad potencial tan pronto como sea posible. Con frecuencia hubo que retirar del mercado sustancias activas porque producían una insuficiencia hepática aguda, es decir, presentaban una toxicidad hepática no reconocida anteriormente.

En el pasado se realizaba la prueba toxicológica de las sustancias activas de medicamentos, pesticidas, aditivos alimentarios y otras sustancias del medio ambiente o bien *in vivo* en animales de ensayo o en sistemas *in vitro*, como bacterias (por ejemplo, test de Ames) y cultivos de células animales. En los sistemas de ensayo bacterianos y algunos de los cultivos de células animales falta sin embargo una actividad metabólica, por lo que los productos tóxicos para el metabolismo no se pueden reconocer con estos sistemas. Para poder solucionar este problema se usaron en el pasado determinados extractos enzimáticos, por ejemplo, extractos de hígado de rata. La actividad metabólica simulada de esta manera no concuerda sin embargo necesariamente con la de los seres humanos o animales. Además puede suceder que metabolitos altamente reactivos no lleguen a las moléculas objetivo y de este modo no se puedan determinar.

Tampoco han faltado ensayos para cultivar células humanas diferenciadas con determinadas actividades metabólicas *in vitro* y así proveer un sistema de prueba con una similitud adecuada al metabolismo humano. Pero como las células diferenciadas sólo se pueden cultivar en forma condicionada, entre otros porque los tratamientos mecánicos y/o enzimáticos que se deben realizar necesariamente para la preparación de cultivos celulares con el objeto de individualizar las células, llevan a una pérdida y/o un daño de los contactos célula-célula, eran necesarias determinadas medidas, para poder establecer siquiera un cultivo de células correspondiente. Así se ensayó, por ejemplo, inmortalizar las células hepáticas, pero esto puede llevar a productos artificiales. Por otro lado, el tejido en cultivo muere normalmente después de un breve lapso de tiempo, ya que no está garantizado en general un intercambio suficiente de nutrientes y productos del metabolismo.

De este modo, los sistemas *in vitro* tienen la desventaja de que no pueden representar el metabolismo complejo del organismo humano o animal. De este modo, los resultados obtenidos con estos sistemas se pueden transponer aún menos que los resultados de los ensayos en animales. El riesgo de una administración de las sustancias a ensayar y/o la captación de éstas,

especialmente por los seres humanos, posiblemente no se pueda determinar o sólo en forma insuficiente.

El objetivo de la presente invención de proveer un equivalente de tejido funcional, con el cual se puedan realizar los tests mencionados en sustancias de manera satisfactoria, se 5 alcanza por la invención por medio de determinadas biomatrizes que se pueden obtener mediante un procedimiento especial y que sirven para la formación de un equivalente de tejido correspondiente.

El objeto de la presente invención es por lo tanto el procedimiento definido en las reivindicaciones de la patente. Se trata de un procedimiento *in vitro*.

10 Con respecto a las sustancias a ensayar se trata de sustancias con las cuales los seres humanos o los animales no humanos, especialmente los animales domésticos o los animales útiles, entran en contacto o pueden llegar a entrar en contacto, es decir, especialmente aquellas que son captadas o podrían ser captadas por el ser humano o un animal no humano. Por lo tanto, entre estas sustancias se cuentan especialmente sustancias activas de los campos de la 15 Farmacia y la protección fitosanitaria, aditivos de alimentos y una cantidad de sustancias del medio ambiente, con las cuales el ser humano o los animales no humanos podrían entrar en contacto.

El procedimiento de acuerdo con la invención sirve en principio para investigar interacciones entre una sustancia a ensayar con el equivalente de tejido. Interacción en este 20 contexto significa tanto un efecto de la sustancia sobre el equivalente de tejido, como también un efecto del equivalente de tejido sobre la sustancia.

Así, con el procedimiento de acuerdo con la invención se puede determinar especialmente, si el equivalente de tejido se modifica bajo el efecto de la sustancia. Una determinación de este tipo comprende en general la investigación de por lo menos un estado 25 (parámetro) en el equivalente de tejido o en una parte del mismo que comprende por lo menos una célula. Como parámetro se pueden usar básicamente todas las magnitudes o medidas de observación que describen un estado determinado del equivalente de tejido. Entre estos se pueden mencionar, por ejemplo, parámetros citológicos, como la morfología celular, la vitalidad celular y la tasa de división celular, parámetros bioquímicos, como determinadas actividades del 30 metabolismo, por ejemplo, la inducción de determinadas enzimas, y la formación de determinados productos del metabolismo, y parámetros de biología molecular, como la presencia de determinados ácidos nucleicos y proteínas.

Se pueden investigar modificaciones de la morfología celular visualmente, por ejemplo, bajo un microscopio. Especialmente se puede determinar el tamaño celular.

35 La vitalidad de las células del equivalente de tejido se puede determinar de manera ya

conocida, por ejemplo, con ayuda de determinados métodos de coloración. La utilización de azul de tripano, rojo neutro u otros substratos cromogénicos, como el 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (coloraciones rojas de las partes vivas) es conocida por el experto para este fin. Se puede mencionar además la determinación 5 electrónica de la vitalidad, como por medio del procedimiento de exclusión de la corriente eléctrica (Tecnología CASY®).

Determinadas actividades enzimáticas, por ejemplo, las enzimas que participan en las biotransformaciones de fase I y/o fase II, se pueden determinar de manera usual bioquímicamente, por ejemplo, usando substratos cuya conversión lleva a un producto que se 10 puede determinar y en lo posible cuantificar. Los ácidos nucleicos y las proteínas, por ejemplo, enzimas, se pueden determinar con los métodos de análisis de biología molecular usuales.

Así, una inducción de una serie de citocromos P450 (por ejemplo, 1A1, 1A2, 2A1, 3A4, 3A5, 2B6, 2C8, 2C9, 2C11, 2C19, 2D6, 2E1) se pueden determinar especialmente en forma 15 enzimática o también por la biología molecular.

De acuerdo con este aspecto, el procedimiento de acuerdo con la invención se dirige especialmente al testeo de sustancias, para determinar si la sustancia que se desea ensayar tiene un efecto tóxico sobre las células del equivalente de tejido (citotoxicidad). En este sentido, de los parámetros antes mencionados se prefieren aquellos que pueden reproducir un efecto 20 citotóxico.

En general se puede determinar una modificación del equivalente de tejido en las células del equivalente de tejido. Pero en determinados casos se puede determinar también una modificación del equivalente de tejido indirectamente en base a una modificación del medio de cultivo, por ejemplo, cuando el equivalente de tejido forma un producto del metabolismo bajo el efecto de la sustancia de prueba, y lo vuela en el medio de cultivo circundante.

Por otra parte, con el procedimiento de acuerdo con la invención se puede determinar 25 también si la sustancia de prueba se modifica bajo el efecto del equivalente de prueba. Tales modificaciones comprenden especialmente una modificación de la estructura química de la sustancia de prueba y la formación de aductos de la sustancia de prueba con otras que son provistas por el equivalente de tejido. La modificación de la sustancia de prueba que se produce bajo el efecto del equivalente de tejido se denomina aquí biotransformación y los productos derivados de la sustancia de prueba, resultantes de ésta, se denominan metabolitos. Tales 30 biotransformaciones comprenden especialmente las biotransformaciones de fase I, como las hidroxilaciones, y las biotransformaciones de fase II, como una glucuronidación, sulfatación, metilación, acetilación, conjugación de aminoácidos y conjugación de glutatión. Las biotransformaciones de fase I sirven en general para aumentar la polaridad de la sustancia de 35

prueba y/o introducir en ésta grupos químicamente reactivos, en los cuales se pueden producir a continuación las transformaciones de fase II.

De acuerdo con este aspecto, el procedimiento de acuerdo con la invención se dirige especialmente al testeo de sustancias, para determinar si la sustancia de prueba es 5 metabolizada por las células del equivalente de tejido (biotransformación).

Los productos que participan en una biotransformación como de este tipo, es decir, especialmente la sustancia a ensayar como educto, así como también los metabolitos derivados de ésta, se pueden determinar en general con los métodos de análisis convencionales, en donde el medio de cultivo y/o las células del equivalente de tejido son sometidas a la 10 determinación. En este contexto deben mencionarse especialmente las técnicas cromatográficas, como la HPLC, procedimientos espectrométricos, como la espectrometría de masas, así como también procedimientos inmunológicos con los cuales se pueden determinar los metabolitos con ayuda de anticuerpos adecuados.

Para llevar a cabo el procedimiento de acuerdo con la invención, se mantiene el 15 equivalente de tejido en general en un medio acuoso, de este modo se alimentan nutrientes y se retiran productos del metabolismo, y se garantiza el intercambio de gases necesario. Adicionalmente, el medio contiene en general los nutrientes requeridos. En este contexto se remite a los medios correspondientes para el cultivo de células humanas. Para equivalentes de 20 tejido hepático, que se usan preferentemente en el procedimiento de acuerdo con la invención, ha demostrado ser adecuado por ejemplo, el medio E de Williams convencional (suplementado con 10 % de suero fetal de ternero). Además son adecuados sueros humanos y/o fracciones de estos.

Para garantizar una alimentación suficiente de nutrientes y/o un intercambio de gases 25 suficiente, en general se mueve el medio. Dispositivos adecuados, en los cuales se pueden cultivar los equivalentes de tejido de acuerdo con la invención, son conocidos por el experto y se encuentran especialmente en el campo de los biorreactores.

La o las sustancias de prueba son agregadas al medio, el cual ya contiene en general el equivalente de tejido, en un momento adecuado. Convenientemente se deseará ensayar 30 diversas concentraciones, por lo que se comienza con la concentración más reducida. Se pueden agregar al medio varias sustancias de prueba como mezcla de sustancias o en forma separada.

La determinación con respecto a si el efecto de la sustancia o las sustancias llevó a una 35 modificación del equivalente de tejido y/o de la o las sustancias, comprende en general por lo menos dos determinaciones de un estado (parámetro), a saber, una determinación antes de la acción y una determinación después de la acción. Si la comparación de los resultados

obtenidos con ambas determinaciones da por resultado una desviación, entonces hay una modificación. Especialmente se pueden realizar más de dos determinaciones del mismo estado y/o determinaciones de varios estados. Para ello es una cuestión de conveniencia prever varios equivalentes de tejido iguales en el mismo medio, de modo que para cada determinación se 5 pueda retirar un equivalente de tejido, sin influir sobre los equivalentes de tejido restantes.

A continuación se describen los equivalentes de tejido propiamente dichos así como también las matrices en las que se basan y su preparación.

El grado de porosidad es el dato cuantitativo en % con respecto a la proporción del volumen de poro en el volumen total de la matriz.

10 Como poros se designan aquí los espacios huecos presentes en la matriz de acuerdo con la invención, los cuales en el presente caso, en el corte bidimensional, tienen una forma poligonal, especialmente octogonal o vistos tridimensionalmente, tienen una forma cuadrada. Preferentemente la forma está caracterizada además por extensiones, de modo que se puede comparar la forma de los espacios huecos con la forma de las células nerviosas. El tamaño de 15 un poro puede ser indicado con ayuda de un diámetro, es decir, el promedio entre el diámetro más largo y el más corto de los poros que se reconocen en el corte bidimensional.

Una matriz de acuerdo con la invención presenta poros con distintos tamaños, estando 20 distribuidos los tamaños en un área determinada (distribución de tamaño de poros, como se define en las reivindicaciones). De acuerdo con la invención es importante que una matriz presente una amplia distribución de poros, que sea más amplia que el área que se extiende desde poros con un tamaño en el rango de aprox. 150 µm hasta poros con un tamaño en el rango de aprox. 300 µm. De acuerdo a esto, una matriz de acuerdo con la invención presenta 25 poros con un tamaño de 130 µm o menos. Además, una matriz de acuerdo con la invención presenta poros con un tamaño de 370 µm o más. Estos valores se pueden combinar con rangos mínimos en los cuales se extiende la distribución de tamaño de poros, en donde se puede mencionar especialmente el rango de 130 a 370 µm. La distribución de tamaños de poros 30 presenta especialmente máximos de frecuencia fuera del área de 150 a 300 µm, es decir, un máximo de frecuencia se encuentra por encima de un tamaño de poros de 300 µm y otro máximo de frecuencia se encuentra por debajo de un tamaño de poros de 150 µm.

35 Una matriz de acuerdo con la invención, típica, presenta la siguiente distribución de tamaño de poros. Aproximadamente del 0,5 % al 6 %, preferentemente aprox. del 1 % al 5 %, más preferentemente aprox. del 2 % al 4 % y especialmente aprox. el 3 % de poros con un diámetro medio en el rango de 70 a 100 µm; aprox. del 2 % al 8 %, preferentemente aprox. del 3 % al 7 %, más preferentemente aún aprox. del 4 % al 6 % y especialmente aprox. el 5 % de poros con un diámetro medio en el rango de 101 a 115 µm; aprox. del 2 % al 8 %,

preferentemente aprox. del 3 % al 7 %, más preferentemente aprox. del 4 % al 6 % y especialmente aprox. el 5 % de poros con un diámetro medio en el rango de 116 a 130 μm ; aprox. del 1 % a 7 %, preferentemente aprox. del 2 % a 6 %, más preferentemente aún del 3 % a 5 % y especialmente aprox. 4 % de poros con un diámetro medio en el rango de 131 a 300 μm ; aprox. del 11 % al 23 %, preferentemente aprox. del 13 % al 21 %, más preferentemente aprox. del 15 % al 19 % y especialmente aprox. el 17 % de poros con un diámetro medio en el rango de 301 a 330 μm ; aprox. del 4 % al 10 %, preferentemente aprox. del 5 % al 9 %, más preferentemente aprox. del 6 % al 8 % y especialmente aprox. 7 % de poros con un diámetro medio en el rango de 331 a 360 μm ; aprox. del 5 % al 17 %, preferentemente aprox. del 7 % al 15 %, más preferentemente aprox. del 9 % al 13 % y especialmente aprox. el 11 % de poros con un diámetro medio en el rango de 361 a 390 μm ; aprox. del 7 % al 19 %, preferentemente aprox. del 9 % al 17 %, más preferentemente aprox. del 11 % al 15 % y especialmente aprox. el 13 % de poros con un diámetro medio en el rango de 391 a 420 μm ; aprox. del 3 % al 9 %, preferentemente aprox. del 4 % al 8 %, más preferentemente aprox. del 5 % al 7 % y especialmente aprox. el 6 % de poros con un diámetro medio en el rango de 421 a 450 μm ; aprox. del 12 % al 24 %, preferentemente aprox. del 14 % al 22 %, más preferentemente aprox. del 16 % al 20 % y especialmente aprox. el 18 % de poros con un diámetro medio en el rango de 451 a 480 μm ; y aprox. del 5 % al 17 %, preferentemente aprox. del 7 % al 15 %, más preferentemente aprox. del 9 % al 13 % y especialmente aprox. el 11 % de poros con un diámetro medio en el rango de 481 a 510 μm . Se obtiene por lo tanto en general una distribución de tamaño de poros con más de un máximo, lo que corresponde a una acumulación de poros en más de un rango de tamaño. Esto es de importancia especial para las propiedades de las matrices de acuerdo con la invención.

El volumen del espacio hueco y por lo tanto el grado de porosidad se puede determinar de manera conocida mediante porosimetría.

Los tamaños de poros y, por lo tanto, también la distribución de tamaño de poros pueden determinarse, por ejemplo, mediante microscopía electrónica de barrido. Para ello se preparan cortes delgados de la matriz a investigar y se recubren con oro. Las imágenes de microscopía electrónica de barrido se evalúan, midiendo todos los poros de una superficie definida, es decir, para cada poro se determinan el diámetro más largo y el más corto, se suman los dos valores y la suma se divide por 2.

El concepto "matriz" se refiere a un soporte tridimensional, que es adecuado para la colonización de células. En este sentido, la matriz sirve como molde de estructura tridimensional ("template") para la colonización de células y/o tejidos. Esta colonización se realiza preferentemente *in vitro*.

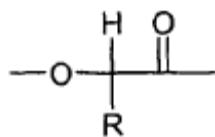
El polímero puede ser en principio cualquier polímero que se usa en este campo. Estos comprenden especialmente los polímeros biocompatibles que permiten la colonización de células vivas sobre el polímero. Se pueden usar polímeros que sustancialmente no son biodegradables o que son por lo menos en su mayor parte biodegradables.

5 El término "biodegradable" se refiere a un material que puede transformar seres vivos (o líquidos corporales o cultivos celulares que se derivan de seres vivos) en productos metabolizables. Entre los polímeros biodegradables se pueden mencionar, por ejemplo, polímeros biorresorbibles o bioerosionables. Bioerosionable designa la capacidad de poder ser disueltos o suspendidos en líquidos biológicos. Biorresorbibles se refiere a la capacidad de ser 10 captado por células, tejidos o líquidos de un ser vivo.

15 Los polímeros biodegradables adecuados de acuerdo con la invención comprenden en principio todos los polímeros que se usan en el campo correspondiente, entre los cuales, aparte de los polímeros ya establecidos en el campo de la ingeniería de los tejidos también se encuentran los polímeros que ya se usan en dispositivos que liberan sustancias activas, como parches o implantes con sustancias activas.

20 Entre los polímeros naturales adecuados se encuentran, por ejemplo, polipéptidos como albúmina, fibrinógeno, colágeno y gelatina, así como también polisacáridos, como quitina, quitosano, alginato y agarosa. Eventualmente estos polímeros naturales también pueden ser modificados, por ejemplo, las proteínas como el colágeno pueden ser reticuladas.

25 Entre los polímeros sintéticos adecuados se encuentran, por ejemplo, determinados polianhídridos, especialmente poli(ácido sebácico–ácido hexadecanoico), poli(s-caprolactona), poli(ortoésteres) y sobre todo poli(α -hidroxíesteres), tales como poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico) y poli(ácido glicólico–ácido láctico). Así las matrices e implantes de acuerdo con la invención se basan preferentemente en polímeros biodegradables, que contiene las unidades de repetición de la fórmula (I):



en donde R¹ representa hidrógeno o metilo. En lo que respecta a las unidades de ácido láctico, se prefiere la forma L (el enantiómero S). Como polímero especialmente preferido debe mencionarse el poli(ácido glicólico–ácido láctico) con una relación entre ácido glicólico y ácido 30 láctico de 99:1 a 1:99, preferentemente 10:90 a 90:10, por ejemplo, 15:85 % en moles.

También pueden ser igualmente convenientes mezclas de dos o más polímeros.

A parte del tipo del polímero, también su peso molecular determina las propiedades de la matriz resultante. En general vale que la porosidad de la matriz disminuye con el peso

molecular creciente del polímero usado. Esto vale especialmente cuando, durante la preparación de la matriz se realiza el espumado del material, es decir, bajo presión se mezcla con un gas como el CO₂, el cual se disuelve primero en el polímero y cuando se disminuye la presión forma los poros.

5 También la cristalinidad del polímero usado tiene un efecto sobre las propiedades de la matriz resultante. Aquí vale que la porosidad de la matriz resultante aumenta en general con la disminución de la cristalinidad, por lo que se prefiere un polímero amorfó especialmente para las matrices con alta porosidad. También este aspecto tiene un rol especialmente cuando el material es espumado durante la preparación de la matriz.

10 Las matrices porosas a base de un polímero biocompatible pueden estar caracterizadas también porque la superficie de la matriz está recubierta con por lo menos una proteína de matriz extracelular.

Las proteínas de la matriz extracelular son conocidas en general. De acuerdo con la invención se prefieren los colágenos, especialmente colágenos del tipo I y IV, laminina y fibronectina. Estas proteínas pueden ser preparadas de manera ya conocida en forma purificada o también se pueden obtener comercialmente. De acuerdo con una forma de realización, los recubrimientos de las matrices de acuerdo con la invención contienen como proteína de matriz extracelular fibronectina. De acuerdo con otra forma de realización, los recubrimientos de matrices de acuerdo con la invención contienen como proteína de matriz extracelular una mezcla de colágeno del tipo I, laminina y colágeno del tipo IV, en donde en ese caso se prefiere que la mezcla contenga las proteínas en partes en peso aproximadamente iguales.

De acuerdo con la invención se prefieren especialmente las matrices que están recubiertas de la forma arriba descripta y que cumplen con por lo menos uno de los siguientes criterios adicionales:

- 25 – Los poros de las matrices presentan los tamaños de poros y/o la distribución de tamaños de poros arriba mencionadas;
- el grado de porosidad es del 93 al 98 %;
- los poros presentan la forma arriba indicada;
- 30 – el polímero biocompatible es uno de los polímeros naturales o sintéticos arriba indicados, especialmente polí(ácido glicólico-ácido láctico) con una parte de ácido láctico de aprox. el 85 % en moles y una parte de ácido glicólico de aprox. el 15 % en moles.

Las matrices recubiertas de esta manera se pueden obtener, por ejemplo, sumergiendo la matriz no recubierta en una solución que contiene la proteína o mezcla de proteínas prevista para el recubrimiento y a continuación se seca la matriz humedecida con la solución. Durante

este procedimiento en general sucede que, dependiendo de las medidas del cuerpo de matriz a recubrir, la solución humedece sobre todo las áreas exteriores del cuerpo de matriz, mientras que en el interior del cuerpo de matriz penetra comparativamente menos solución. Esto puede tener como consecuencia que no resulta un recubrimiento uniforme de toda la superficie de la matriz, sino que el espesor del recubrimiento disminuye de afuera hacia adentro.

Alternativa o adicionalmente a un recubrimiento, las sustancias biológicamente activas pueden ser captadas en el polímero o incluso estar unidas al mismo. Entre éstas se pueden mencionar, por ejemplo, sustancias activas sintéticas (moléculas inorgánicas u orgánicas), proteínas, polisacáridos y otros azúcares, lípidos y ácidos nucleicos, los cuales influyen sobre, por ejemplo, el crecimiento celular, la migración celular, la división celular, la diferenciación celular y/o el crecimiento del tejido, y/o poseen efectos terapéuticos, profilácticos o diagnósticos. Pueden mencionarse, por ejemplo, sustancias activas vasculares, sustancias neuroactivas, hormonas, factores de crecimiento, citoquinas, esteroides, anticoagulantes, sustancias activas antiinflamatorias, sustancias activas inmunomoduladoras, sustancias activas citotóxicas, antibióticos y sustancias activas antivirales.

Un procedimiento para la preparación de una matriz porosa a base de un polímero o mezcla de polímeros biocompatible está caracterizado porque una mezcla de partículas de polímeros y partículas de sal común con un tamaño de grano definido es compactada y a continuación se elimina la sal común por disolución.

Las partículas de polímeros con un tamaño de grano en el rango de aprox. 20 a 950 µm, ventajosamente en el rango de aprox. 20 a 760 µm y especialmente en el rango de aprox. 108 a 250 µm y partículas de sal común con un tamaño de grano en el rango de aprox. 90 a 670 µm, ventajosamente en el rango de aprox. 110 a 520 µm y especialmente en el rango de aprox. 250 a 425 µm, han demostrado ser convenientes para la regulación del tamaño de los poros y/o la distribución del tamaño de poros deseados. Además ha demostrado ser conveniente una relación de pesos entre las partículas de polímero y las partículas de sal común en el rango de 1:100 a 1:10, ventajosamente en el rango de 1:50 a 1:15 y especialmente en el rango de aprox. 1:20 a 1:18 para la regulación de la porosidad deseada.

Ha demostrado ser conveniente además usar sal y polímero con una distribución de tamaño de poro determinada. En lo que se refiere a la sal común usada para la preparación de la matriz, es conveniente cuando la parte de sal con un tamaño de grano de 250 µm a 320 µm es de aprox. el 15 % al 50 %, ventajosamente es de aprox. el 18 % al 42 % y preferentemente de aprox. el 22 % al 28 %; la parte de sal con un tamaño de grano de 330 µm a 380 µm es de aprox. de 20 % al 65 %, ventajosamente es de aprox. el 30 % al 52 % y preferentemente de aprox. el 42 % al 46 %; y la parte de sal con un tamaño de grano de 390 µm a 425 µm es de

aprox. el 15 % al 62 %, ventajosamente es de aprox. el 25 % al 42 % y preferentemente de aprox. el 29 % al 33 %, en donde los datos en porcentaje se refieren al peso total de la sal usada para la preparación. No se excluyen con ello partes con tamaños de grano mayores y/o menores que los rangos indicados.

5 De acuerdo con una forma de realización especial ha demostrado ser conveniente cuando la parte de partículas de sal común con un tamaño de grano de 108 µm a 140 µm es del 1 al 15 % en peso, preferentemente del 4 al 12 % en peso, y especialmente del 7 al 9 % en peso, la parte de sal con un tamaño de grano de 145 µm a 180 µm es del 1 al 11 % en peso, preferentemente del 3 al 9 % en peso y especialmente del 5 al 7 % en peso, la parte de sal con
10 un tamaño de grano de 185 µm a 220 µm es del 3 al 21 % en peso, preferentemente del 7 al 17 % en peso, y especialmente del 10 al 14 % en peso, la parte de sal con un tamaño de grano de 225 µm a 250 µm es del 1 al 11 % en peso, preferentemente del 3 al 9 % en peso, y especialmente del 5 al 7 % en peso, la parte de sal con un tamaño de grano de 250 µm a 320 µm es del 15 al 50 % en peso, preferentemente del 18 al 42 % en peso, y especialmente del 22
15 al 28 % en peso, la parte de sal con un tamaño de grano de 330 µm a 380 µm es del 15 al 50 % en peso, preferentemente del 18 al 42 % en peso, y especialmente del 22 al 28 % en peso, y la parte de sal con un tamaño de grano de 390 µm a 425 µm es del 5 al 29 % en peso, preferentemente del 10 al 24 % en peso, y especialmente del 15 al 19 % en peso.

En lo que se refiere al polímero usado para la preparación de la matriz, es conveniente
20 cuando la parte de polímero con un tamaño de grano de 108 µm a 140 µm es de aprox. el 5 a 50 %, ventajosamente de aprox. el 10 al 30 % y preferentemente de aprox. el 14 al 18 %, la parte de polímero con un tamaño de grano de 145 µm a 180 µm es de aprox. el 10 al 55 %, ventajosamente de aprox. el 15 al 40 % y preferentemente de aprox. el 20 al 24 %; la parte de polímero con un tamaño de grano de 185 µm a 220 µm es de aprox. el 18 al 88 %,
25 ventajosamente de aprox. el 32 al 76 % y preferentemente de aprox. el 43 al 49 %; y la parte de polímero con un tamaño de grano de 225 µm a 250 µm es de aprox. el 5 al 45 %, ventajosamente de aprox. el 10 al 28 % y preferentemente de aprox. el 14 al 18 %; en donde los datos en porcentaje se refieren al peso total de polímero usado.

Para obtener partículas de sal y de polímero de la distribución de tamaño de grano deseada, en general es conveniente triturar primero el material disponible en el comercio usualmente. Esto se puede realizar en dispositivos usuales para ello, por ejemplo, trituradores o molinos. Pero para la distribución de tamaño de grano deseada es determinante el tamizado subsiguiente con ayuda de tamices de análisis.

La compactación se realiza preferentemente por efecto de presión. Para ello se puede
35 comprimir la mezcla de polímero/sal en una prensa hidráulica convencional con un presión de

estampado en el rango de aprox. 780 psi a 1450 psi, ventajosamente en el rango de aprox. 840 psi a 1230 psi y especialmente en el rango de aprox. 900 psi a 1100 psi. Ha demostrado ser conveniente dejar actuar la presión aprox. 10 s a 360 s, ventajosamente aprox. 40 s a 180 s y especialmente aprox. 50 s a 70 s a temperaturas en el rango de 18 °C a 25 °C.

5 La eliminación de la sal común por disolución se realiza por ejemplo, con agua o soluciones acuosas. Así, la mezcla compactada (probeta de matriz) se puede diluir aprox. 1 h a 80 h, ventajosamente aprox. 12 h a 62 h y especialmente aprox. 36 h a 60 h.

Además es ventajoso cuando la mezcla compactada se almacena antes de la eliminación de la sal común primero en una atmósfera de CO₂. Así se puede gasificar la mezcla 10 compactada, por ejemplo, con una presión de CO₂ en el rango de aprox. 140 psi a 1650 psi, ventajosamente en el rango de 360 psi a 1120 psi y especialmente en el rango de aprox. 800 psi a 900 psi, en donde han demostrado ser convenientes tiempos en el rango de 1 h a 180 h, ventajosamente en el rango de aprox. 3 h a 60 h y especialmente en el rango de aprox. 12 h a 15 36 h. Luego se reduce la presión, en donde la velocidad de disminución de la presión influye sobre la formación de los poros. Si bien se prefiere el uso de CO₂, también pueden ser adecuados otros gases, como aire, nitrógeno, helio, neón, criptón, argón, xenón u oxígeno.

A continuación se elimina el agua o la solución acuosa para el secado de manera conocida. Para ello se puede colocar la matriz, por ejemplo, sobre papel absorbente.

De acuerdo con una forma de realización preferida, se agrega a la mezcla de partículas 20 de polímero y partículas de sal común una solución de polímeros y se elimina el disolvente, antes de compactar. Para ello las partículas de polímero y la solución de polímero pueden basarse en el mismo polímero. Pero también pueden ser polímeros diferentes, especialmente con una biodegradabilidad diferente. El uso de la solución de polímero tiene la ventaja de que se introducen en la matriz cuasipilares de soporte, por lo que se puede mejorar las propiedades 25 mecánicas de la matriz. Una matriz como ésta presenta especialmente una menor tendencia a desmenuzarse.

El disolvente usado debería disolver el polímero, pero no la sal. De este modo se garantiza que las propiedades porogénicas de la sal no se vean influenciadas o sólo en forma insignificante. Acetona, acetato de etilo, cloruro de metileno, cloroformo, hexafluoroisopropanol, 30 hidrocarburos clorados y fluorados, alifáticos y aromáticos, tetrahidrofurano, etilmelilcetona, dietilcetona, así como también mezclas de los mismos son apropiados, por ejemplo, para disolver los polímeros arriba mencionados. Para disolver poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico) o poli(ácido glicólico–ácido láctico) y teniendo en cuenta el uso medicinal, es especialmente adecuado el cloroformo.

35 Si se agregan la solución de polímero y la mezcla de partículas de polímero/partículas

de sal juntos, se forma primero una lechada que se puede agitar, la cual después de retirar el disolvente se solidifica rápidamente. La concentración del polímero en la solución debe elegirse convenientemente de tal modo que por un lado el polímero se disuelva completamente, por otro lado el disolvente se pueda eliminar rápidamente sin atraer en una medida significativa las partículas de polímeros.

Ha demostrado ser conveniente una relación de pesos entre partículas de polímero y polímero disuelto de 10:1 a 1:100, ventajosamente 2:1 a 1:25 y especialmente 1:1 a 1:10.

En lo que respecta a la relación de pesos entre partículas de polímeros y partículas de sal común, en el marco de esta forma de realización se puede elegir una relación de pesos más alta a favor de la sal común de hasta 1:200, 1:500 o 1:1000, en donde la relación de pesos entre polímero total y sal es siempre mayor que 1:100. De esta manera se logra regular las porosidades por encima del 98 %.

En el procedimiento descripto más arriba la sal común sirve como material porogénico, con lo que, de acuerdo con la invención, se define un material sólido o por lo menos semisólido, el cual se une primero con el polímero que forma la matriz como una mezcla y luego es retirado de vuelta de la mezcla, formando de este modo espacios huecos (poros). Para ello es conveniente que el material porogénico sea soluble en por lo menos un disolvente y sea insoluble en por lo menos otro disolvente. Substancialmente insoluble es un material especialmente cuando bajo las condiciones de procesamiento, es decir, en general a temperaturas en el rango de 18 °C a 25 °C y bajo presión normal, se disuelve menos del 30 % en peso, preferentemente menos del 20 % en peso, especialmente menos del 10 % en peso, por ejemplo, menos del 5, 4, 3, 2 y 1 % en peso.

La estructura y las propiedades de las matrices resultantes se determinan sustancialmente por medio del material porogénico usado para su preparación. Aquí tienen un rol no sólo el tipo del material porogénico, sino sobre todo la distribución del tamaño de grano de la partícula porogénica. Así vale en general, que con el aumento del tamaño de grano no sólo aumenta el tamaño de los poros sino también la conectividad, es decir, la red de espacios huecos que se comunican entre sí. Esta red, también denominada macroestructura o estructura macroporosa, debe diferenciarse de los poros que se obtienen por el espumado, los cuales en general son cerrados y por lo tanto forman una estructura denominada microestructura o microporosa.

Se pueden obtener por lo tanto matrices especiales de acuerdo con un procedimiento para la preparación de una matriz porosa a base de un polímero o mezcla de polímeros biocompatible, el cual se caracteriza porque una mezcla de partículas de polímeros, partículas de un material porogénica y una solución de polímeros, se compacta y a continuación se

elimina el material porogénico por disolución.

Este procedimiento no se limita básicamente a las propiedades antes descriptas. Así, el polímero se puede elegir entre polianhídridos, poli(ortoésteres), poli(α -hidroxiésteres), poli(ésteramidas), poliamidas, poli(ésteres-éteres), policarbonatos, polialquilenos, 5 polialquilenglicoles, óxidos de polialquieno, tereftalatos de polialquieno, alcoholes polivinílicos, éteres polivinílicos, ésteres polivinílicos, halogenuros de polivinilo, polivinilpirrolidonas, polisiloxanos, poliestirenos, poliuretanos, celulosas derivadas, polímeros y copolímeros del ácido (met)acrílico. El material porogénico es seleccionado preferentemente entre sales solubles en agua, por ejemplo, cloruro de sodio, cloruro de potasio, fluoruro de sodio, fluoruro 10 de potasio, yoduro de sodio, yoduro de potasio, nitrato de sodio, sulfato de sodio, citrato de sodio, tartrato de sodio, azúcares (por ejemplo, sacarosa, fructosa, glucosa) y mezclas de los mismos, pueden ser sin embargo también sustancias de tipo ceroso, como parafinas, cera de abejas y similares. El polímero, el material porogénico y el disolvente usado para formar la solución deben adecuarse básicamente de tal modo entre sí, que la solución contenga polímero 15 en forma disuelta y partículas de polímeros en forma sólida y que no disuelva sustancialmente el material porogénico.

Las matrices descriptas con el procedimiento arriba descripto se usan preferentemente de acuerdo con la invención.

Para ensayar sustancias de acuerdo con la invención se usan equivalentes de tejidos los cuales comprenden por lo menos una de las matrices arriba descriptas y por lo menos una célula. Según la finalidad de uso se pueden elegir las células entre células hepáticas, células pancreáticas, células adiposas, células intestinales, células de la piel, células vasculares, células nerviosas, células musculares, células de la tiroides y células radiculares de los dientes. Formas de realización especiales de los equivalentes de tejidos se refieren a células hepáticas 25 y células pancreáticas.

Para ensayar sustancias de acuerdo con la invención se usan preferentemente equivalentes de tejidos que comprenden por lo menos una matriz a base de un polímero biocompatible y células de por lo menos dos tipos celulares, en donde las células del primer tipo son hepatocitos y las células del segundo tipo son células de los islotes de Langerhans.

Según la finalidad de uso, es decir, especialmente de la función a cumplir, son ventajosas determinadas relaciones entre hepatocitos y células de los islotes de Langerhans. Así una forma de realización de la invención se refiere al uso de equivalentes de tejidos que muestran las propiedades endocrinas de un órgano pancreático equivalente. Para ello ha demostrado ser ventajosa una relación entre hepatocitos e islotes de Langerhans de aprox. 30 10^6 :3000. Otra forma de realización de la invención se refiere al uso de equivalentes de tejidos,

que cumplen con las funciones metabólicas de un hígado. Para ello ha demostrado ser conveniente una relación entre hepatocitos e islotes de Langerhans de aprox. 10^6 :3–200, ventajosamente de 10^6 :10–100, especialmente de 10^6 : 20–80 y más preferentemente de aprox. 10^6 : 35–45.

5 Debe señalarse que equivalentes de tejido de este tipo comprenden aparte de hepatocitos y células de los islotes de Langerhans otras células, a saber, especialmente otras células hepáticas y pancreáticas que se obtienen durante el aislamiento de las células.

10 Las células o mezclas de células a usar para la colonización de matrices de acuerdo con la invención se pueden obtener de manera conocida. Así, por ejemplo, se puede obtener de un individuo un tejido adecuado, por ejemplo, un trozo de hígado o páncreas, y se puede preparar de manera adecuada para la inoculación y el cultivo *in vitro* en la matriz. Aquí es importante que las células presenten una tasa de vitalidad en lo posible alta.

15 Si se obtienen células hepáticas de tejido hepático, debe observarse que las células hepáticas pueden estar rodeadas de una fuerte capa de tejido conectivo. Para poder aislar células hepáticas con una parte en lo posible alta de células vitales, se usan de acuerdo con la invención soluciones de una composición determinada.

20 Especialmente se puede usar una composición A, acuosa, que contiene NaCl, KCl y HEPES, con un valor de pH de aprox. 7,4, así como también para la perfusión del trozo de hígado o páncreas. Especialmente, 1000 ml de esta solución contienen 8,3 g de NaCl, 0,5 g de KCl y 2,38 de HEPES. La perfusión se realiza preferentemente a una temperatura de aprox. 37 °C y un caudal de aprox. 30 ml/min. Unos pocos minutos, especialmente aprox. 5 a 120 minutos, por ejemplo, aprox. 7 minutos, son suficientes para perfundir el trozo de tejido en forma suficiente con el caudal arriba mencionado.

25 Alternativamente se puede usar también una composición A' acuosa que contiene ácido etilenglicol-tetraacético (EGTA) para perfundir un trozo de hígado o páncreas.

30 Además se puede usar una composición B acuosa con un valor de pH de aprox. 7,3 a 7,4, preferentemente aprox. 7,35, que contiene NaCl, KCl, HEPES, CaCl_2 , colagenasa e inhibidor de tripsina, para perfundir un trozo de hígado o de páncreas. Preferentemente 1000 ml de la solución contienen 8,3 g de NaCl, 0,5 g de KCl, 2,38 de HEPES, 0,7 g de $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, 500 mg de colagenasa H y 7,5 mg de inhibidor de tripsina. También en este caso ha demostrado ser conveniente la perfusión a aprox. 37 °C y un caudal de aprox. 30 ml/min. Unos pocos minutos, especialmente aprox. 5 a 10 minutos, por ejemplo, aprox. 6 a 7 minutos, son suficientes para perfundir en forma suficiente el trozo de tejido.

35 Alternativamente se puede usar también una composición B' acuosa para perfundir un trozo de hígado o de páncreas, que contiene colagenasa y hialuronidasa. Preferentemente,

1000 ml de la solución contienen 5 a 10 U/ml de colagenasa y 5 a 10 U/ml de hialuronidasa.

Es ventajoso para la vitalidad de las células a obtener, cuando el trozo de tejido es tratado primero con una composición A y a continuación con la composición B. Alternativamente se puede usar primero una composición A' y luego una composición B'.

5 A continuación de la perfusión se puede preparar libremente el trozo de tejido y se puede verter cuidadosamente en un medio adecuado, por ejemplo, el medio E de Williams. Si la suspensión celular resultante contiene todavía debris celular aún grueso, éste se puede retirar de manera conocida, por ejemplo, filtrando la suspensión celular a través de una red de nylon (200 µm). Las células del filtrado pueden ser pelletizadas cuidadosamente, demostrando ser
10 ventajosa una centrifugación de 3 minutos a 50 g y 4 °C.

La aplicación de las células obtenidas sobre las matrices se realiza de manera conocida. En general se aplican las células como una solución que contiene células sobre la matriz y a continuación –usualmente bajo condiciones de cultivo celular– se incuban, hasta que las células se adhieren a la matriz. Si se aplica más de un tipo celular, por ejemplo, hepatocitos e islotes de
15 Langerhans, sobre una matriz, pueden aplicarse diversos tipos celulares en principio juntos o uno al lado del otro. De acuerdo con una forma de realización especial se aplican primero células de los islotes de Langerhans y a continuación hepatocitos, en donde después de la aplicación se incuba en cada caso, hasta que por lo menos una parte de las células se adhiere a la matriz.

20 Las matrices y equivalentes de tejido de acuerdo con la invención presentan ventajas decisivas. Así, las dimensiones interiores de las matrices posibilitan una colonización eficiente con células. Por un lado, las matrices se pueden conformar libremente y por otro lado ofrecen suficiente estabilidad y rigidez. Las matrices de acuerdo con la invención pueden ser preparadas sin tener que usar disolventes fisiológicamente peligrosos, por ejemplo, formaldehído, de modo que no se requiere un procedimiento especial para la eliminación del disolvente y no existe el peligro de que queden cantidades residuales de estos disolventes.
25

30 Los equivalentes de tejidos de acuerdo con la invención presentan múltiples posibilidades de uso. Entre éstas se pueden mencionar especialmente usos *in vitro*. Otro objeto de la presente invención son por lo tanto los equivalentes de tejido de acuerdo con la invención para el uso *in vitro*.

Un uso especial en este campo se basa en la formación de tejido (“tissue engineering”). Para ello sirven las matrices de acuerdo con la invención casi como armazón (“scaffold”), en el cual se pueden introducir y/o adherir las células.

35 Pare ello se pueden inocular las matrices además, por ejemplo, *in vitro* con las células deseadas, por ejemplo, se pueden mezclar e incubar con una solución que contiene células,

hasta que se hayan adherido las células a la matriz. Una matriz como ésta con las células adheridas (aquí designada como equivalente de tejido) puede ser sometida luego a otros cultivos, eventualmente bajo la acción de sustancias activas, por ejemplo, para la expansión ulterior de las células o para la modulación de sus propiedades, y/o se pueden guardar hasta el 5 uso de manera adecuada, por ejemplo, sobre hielo o en un reactor de bioflujo bajo condiciones estándar. En el marco de ese uso es ventajoso aislar las células determinadas para ensayar las sustancias primero *in vitro* y eventualmente también poder expandirlas. De este modo se posibilita especialmente la aplicación de diversos tipos de células, como los hepatocitos arriba descriptos junto con las células de los islotes de Langerhans, sobre la matriz.

10 Los siguientes ejemplos tienen por objeto ilustrar la invención, sin limitarla.

Ejemplo 1

Preparación de la matriz

a) Sin solución de polímeros

Pellets de polímero (Resomer® RG 858, que se puede obtener de la Cía. Boehringer, 15 Ingelheim) se congelan en nitrógeno líquido y se trituran en estado congelado (trituradora de la Cía. Däschle; 12000 rpm 2 min). Las partículas de polímero trituradas se tamizan. Las partículas con un tamaño de 108 µm a 250 µm se usan para la preparación de la matriz. Para ello el 16 % en peso del polímero posee un tamaño de partículas entre 108 µm y 140 µm, el 22 % en peso del polímero usado posee un tamaño de partículas entre 145 µm y 180 µ, el 46 % en 20 peso del polímero usado posee un tamaño de partículas entre 185 µm y 220 µm, y el 16 % en peso del polímero usado posee un tamaño de partículas de entre 225 µm y 250 µm. Se tamiza la sal y se usan partículas de sal común con un tamaño de grano de 250 µm a 425 µm para la preparación de la matriz. Para ello el 25 % en peso de la sal usada posee un tamaño de partículas de entre 250 µm y 320 µm, el 44 % en peso de la sal usada posee un tamaño de 25 25 partículas entre 330 µm y 380 µm y el 31 % en peso de la sal usada posee un tamaño de partículas entre 390 µm y 425 µm. Se mezclan 760 mg de partículas de sal común y 40 mg de partículas de polímero. La mezcla se coloca en un molde de estampado y se prensa con una prensa hidráulica con una presión de estampado de 1000 psi durante 1 minuto. A continuación se colocan las probetas de la matriz sobre un plato de teflón y se gasifican durante 24 horas en 30 una atmósfera de CO₂ (850 psi). Luego se colocan en agua las probetas durante 24 horas para disolver los granos de sal incluidos. Finalmente se secan las matrices durante 12 horas sobre papel absorbente.

35 La matriz de polímero resultante presenta una porosidad de 95 +/- 2 % y un tamaño de poros determinado por medio de microscopía electrónica de barrido definida de 250 µm +/- 120 µm.

b) Con solución de polímero

Se muele sal común (analíticamente pura) (trituradora de la Cía. Däschle; 12000 rpm 2 min) y a continuación se tamiza, y se usan partículas de sal común con un tamaño de grano de 108 a 425 µm para la preparación de la matriz. Para ello el 8 % en peso de la sal usada posee 5 un tamaño de partículas de entre 108 µm y 140 µm, el 6 % en peso de la sal usada posee un tamaño de partículas entre 145 µm y 180 µm, el 12 % en peso de la sal usada posee un tamaño de partículas entre 185 µm y 220 µm, el 6 % en peso de la sal usada posee un tamaño de partículas entre 225 µm y 250 µm, el 25 % en peso de la sal usada posee un tamaño de partículas entre 250 µm y 320 µm, el 26 % en peso de la sal usada posee un tamaño de partículas entre 330 µm y 380 µm, y el 17 % en peso de la sal usada posee un tamaño de partículas entre 390 µm y 425 µm. Se mezclan 96 g de partículas de sal común con 1 g de las 10 partículas de polímero descriptas en el Ejemplo 1 a) y a continuación se mezclan con 100 ml de una solución de cloroformo, que contiene 4 g del polímero disuelto. La mezcla así obtenida se calienta a 45 °C hasta 65 °C, por lo que el cloroformo se evapora dentro de aprox. 25 minutos. 15 La mezcla de sal y polímero que queda se prensa luego con una prensa hidráulica con una presión de estampado de 1000 psi durante 1 minuto y a continuación se coloca en agua para disolver los granos de sal incluidos. A continuación se gasifica la matriz, como se describió más arriba y finalmente se seca durante 12 horas sobre papel absorbente.

La matriz de polímero resultante presenta una porosidad del 96 %.

Si se mezclan 98,5 g de partículas de sal con 0,5 g de partículas de polímeros y se mezcla la mezcla con 100 ml de una solución de cloroformo, que contiene 1 g de polímero, se obtiene una matriz con una porosidad del 99 %.

Si se mezclan 99,2 g de partículas de sal con 0,1 g de partículas de polímeros y se mezcla esta mezcla con 100 ml de una solución de cloroformo, que contiene aprox. 0,9 g de 25 polímero, se obtiene una matriz de polímero con una porosidad del 99 %.

Ejemplo 2

a) Recubrimiento de la matriz con fibronectina

La matriz del Ejemplo 1 se sumerge en una solución de búfer carbonato que contiene 3 µg/ml de fibronectina de plasma humano (Sigma) con un valor de pH de 9,4. Despues de aprox. 30 60 s se retira la matriz de la solución, se liofiliza y se esteriliza con γ.

Ejemplo 3

Aislamiento de las células

Un trozo de hígado de un donante humano se perfunde primero 7 minutos a un caudal de 30 ml/min y 37 °C con una solución (8,3 g de NaCl; 0,5 g de KCl; 2,38 g de HEPES; a 1000 35 ml de agua destilada; valor de pH 7,4). A continuación se perfunde el trozo de hígado otros 6 a

7 min a un caudal de 30 ml/min y 37 °C con una solución de colagenasa–inhibidor de tripsina (8,3 g de NaCl; 0,5 g de KCl; 2,38 g de HEPES; 0,7 g de CaCl₂ x 2 H₂O; 500 mg de colagenasa (Collagenase H, Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania); 7,5 mg de inhibidor de tripsina (ICN, Eschwege, Alemania); a 1000 ml de agua destilada; valor de pH 7,35). Despues de 5 finalizar la perfusión se preparó el trozo de hígado libremente y se agitó cuidadosamente en medio E de Williams. La suspensión celular se filtró (red de nylon; 200 µm y a continuación se lavó con medio E de Williams. A continuación se centrifugaron las células durante 3 minutos a 50 g y 4 °C. La vitalidad de las células determinada con azul de tripano es del 95 %.

De igual manera se aíslan las células de los islotes de Langerhans del trozo de 10 páncreas.

Ejemplo 4

Colonización celular

Las matrices recubiertas en el Ejemplo 2 se incuban en el primer paso con células de los islotes de Langerhans, las cuales fueron aisladas de acuerdo con el Ejemplo 3.

15 Para ello se suspendieron 3000 células de los islotes por ml en una mezcla de solución de M199 y FKS (relación de volumen de 19:1). El número de células se determina contándolas bajo un microscopio Olympus invertido en un tubo de conteo de 0,25 mm. Luego se aplican 8 ml a 10 ml de esta solución con una pipeta sobre la matriz. La solución excedente, que no queda en la matriz, se elimina. La matriz así tratada se coloca luego en el armario de incubación de 20 cultivo celular para la adhesión de las células durante 4 horas. A continuación se aplica sobre la matriz una solución de medio E de Williams, la que contiene por ml una suspensión de células hepáticas no purificada con aprox. $5,0 \times 10^7$ hepatocitos y aprox. $1,0 \times 10^8$ células hepáticas no parenquimatosas. Se aplican 8 ml a 12 ml con una pipeta; la solución excedente que no es captada por la matriz se elimina.

Ejemplo 5

Inducción de un citocromo P450 por benceno

30 Un equivalente de tejido obtenido de acuerdo con el Ejemplo 4 (aprox. 124 mm x 45 mm x 5 mm) se divide en 8 tiras. A las tiras se colocan en aprox. 1 l de medio E de Williams, que se agita. Se garantiza un intercambio de gases suficiente y se mantiene la temperatura del medio en 37°C.

Despues que se equilibró el sistema se retira una primera tira de equivalente de tejido y se determina aquí a través del procedimiento de prueba EFCOD la actividad del CYP2E1. Con el procedimiento mencionado se determina la O–desalquilación mediada por CYP2E1 de 7–etoxi–4–trifluorometilcumarina a 7–hidroxi–4–trifluorometil–cumarina.

35 A continuación, se agrega al medio suficiente benceno como para que la concentración

de benceno sea de 0,005 mM. Se deja actuar el benceno durante varias horas, haciendo que se mueva el medio y se garantice un intercambio de gas. Luego se determina nuevamente la actividad de CYP2E1 de la manera arriba mencionada.

A continuación se aumenta la concentración de benceno a 0,01, 0,02, 0,05 y 0,1 mM,
5 determinando la actividad de CYP2E1 después de la acción de la concentración de benceno correspondiente.

Una comparación de las actividades de CYP2E1 medidas de esta manera muestra un claro aumento de la actividad básica con la creciente concentración de benceno – una modificación que refleja la conocida toxicidad hepática del benceno.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para ensayar una o más sustancias, en donde se cultiva un equivalente de tejido, la o las sustancias se dejan actuar sobre el equivalente de tejido, y se determina si la acción de la o las sustancias llevó a una modificación del equivalente de tejido y/o de la o las sustancias, caracterizado porque el equivalente de tejido comprende por lo menos una célula de tejido y una matriz porosa a base de un polímero o mezcla de polímeros biocompatible, en donde la matriz presenta aprox. del 0,5 % al 6 % de poros con un diámetro medio en el rango de 70 a 100 μm ; aprox. del 2 % al 8 % de poros con un diámetro medio en el rango de 101 a 115 μm ; aprox. del 2 % al 8 % de poros con un diámetro medio en el rango de 116 a 130 μm ;
5 aprox. del 1 % al 7 % de poros con un diámetro medio en el rango de 131 a 300 μm ; aprox. del 11 % al 23 % de poros con un diámetro medio en el rango de 301 a 330 μm ; aprox. del 4 % al 10 % de poros con un diámetro medio en el rango de 331 a 360 μm ; aprox. del 5 % al 17 % de poros con un diámetro medio en el rango de 361 a 390 μm ; aprox. del 7 % al 19 % de poros con un diámetro medio en el rango de 391 a 420 μm ; aprox. del 3 % al 9 % de poros con un diámetro medio en el rango de 421 a 450 μm ; aprox. del 12 % al 24 % de poros con un diámetro medio en el rango de 451 a 480 μm ; y aprox. del 5 % al 17 % de poros con un diámetro medio en el rango de 481 a 510 μm , el grado de porosidad es del 93 al 98 % y la matriz se puede obtener por medio de la compactación de una mezcla de partículas de polímero y partículas de sal común y luego la eliminación de la sal común por disolución.
10
15
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la matriz presenta aprox. del 1 % al 5 % de poros con un diámetro medio en el rango de 70 a 100 μm ; aprox. del 3 % al 7 % de poros con un diámetro medio en el rango de 101 a 115 μm ; aprox. del 3 % al 7 % de poros con un diámetro medio en el rango de 116 a 130 μm ; aprox. del 2 % al 6 % de poros con un diámetro medio en el rango de 131 a 300 μm ; aprox. del 13 % al 21 % de poros con un diámetro medio en el rango de 301 a 330 μm ; aprox. del 5 % al 9 % de poros con un diámetro medio en el rango de 331 a 360 μm ; aprox. del 7 % al 15 % de poros con un diámetro medio en el rango de 361 a 390 μm ; aprox. del 9 % al 17 % de poros con un diámetro medio en el rango de 391 a 420 μm ; aprox. del 4 % al 8 % de poros con un diámetro medio en el rango de 421 a 450 μm ; aprox. del 14 % al 22 % de poros con un diámetro medio en el rango de 451 a 480 μm ; y aprox. del 7 % al 15 % de poros con un diámetro medio en el rango de 481 a 510 μm .
20
25
30
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la matriz presenta aprox. del 2 % al 4 % de poros con un diámetro medio en el rango de 70 a 100 μm ; aprox. del 4 % al 6 % de poros con un diámetro medio en el rango de 101 a 115 μm ; aprox. del 4 % al 6 % de poros con un diámetro medio en el rango de 116 a 130 μm ; del 3 % al 5 % de poros con un diámetro medio en el rango de 131 a 300 μm ; aprox. del 15 % al 19 % de poros
35

con un diámetro medio en el rango de 301 a 330 μm ; aprox. del 6 % al 8 % de poros con un diámetro medio en el rango de 331 a 360 μm ; aprox. del 9 % al 13 % de poros con un diámetro medio en el rango de 361 a 390 μm ; aprox. del 11 % al 15 % de poros con un diámetro medio en el rango de 391 a 420 μm ; aprox. del 5 % al 7 % de poros con un diámetro medio en el rango 5 de 421 a 450 μm ; aprox. del 16 % al 20 % de poros con un diámetro medio en el rango de 451 a 480 μm ; y aprox. del 9 % al 13 % de poros con un diámetro medio en el rango de 481 a 510 μm .

4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la matriz presenta aprox. el 3 % de poros con un diámetro medio en el rango de 70 a 100 μm ; aprox. el 5 % de poros con un diámetro medio en el rango de 101 a 115 μm ; aprox. el 5 % de poros con un diámetro medio en el rango de 116 a 130 μm ; aprox. el 4 % de poros con un diámetro medio en el rango de 131 a 300 μm ; aprox. el 17 % de poros con un diámetro medio en el rango de 301 a 330 μm ; aprox. el 7 % de poros con un diámetro medio en el rango de 331 a 360 μm ; aprox. el 11 % de poros con un diámetro medio en el rango de 361 a 390 μm ; aprox. el 13 % de poros con un diámetro medio en el rango de 391 a 420 μm ; aprox. el 6 % de poros con un diámetro medio en el rango 10 de 421 a 450 μm ; aprox. el 18 % de poros con un diámetro medio en el rango de 451 a 480 μm ; y aprox. el 11 % de poros con un diámetro medio en el rango de 481 a 510 μm .

5. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el polímero biocompatible es un polímero biodegradable, seleccionado entre polímeros naturales, tales como albúmina, fibrinógeno, colágeno, gelatina, quitina, quitosano, agarosa, alginato, y polímeros sintéticos, tales como polianhídridos, poli(ϵ -caprolactona) y poli(α -hidroxiésteres).

6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado porque el polímero biodegradable es poli(ácido glicólico-ácido láctico) con un contenido de ácido láctico de aprox. 25 el 85 % en moles y un contenido de ácido glicólico de aprox. el 15 % en moles.

7. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque la superficie de la matriz está recubierta con por lo menos una proteína de la matriz extracelular, seleccionada entre colágenos, laminina y fibronectina.

8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado porque el 30 recubrimiento contiene una mezcla de colágeno del tipo I, laminina y colágeno del tipo IV.

9. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la matriz porosa a base de un polímero o mezcla de polímeros biocompatible se puede obtener compactando una mezcla de partículas de polímero con un tamaño de grano en el rango de aprox. 20 a 950 μm , ventajosamente en el rango de aprox. 50 a 760 μm y 35 especialmente en el rango de aprox. 108 a 250 μm y partículas de sal común con un tamaño de

grano en el rango de aprox. 90 a 670 μm , ventajosamente en el rango de aprox. 110 a 520 μm y especialmente en el rango de aprox. 250 a 425 μm y a continuación eliminando la sal común por disolución.

10. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizado porque la mezcla de 5 partículas de sal común está compuesta por el 15 al 50 % en peso, preferentemente el 18 al 42 % en peso y especialmente el 22 al 28 % en peso de partículas con un tamaño de grano de 250 μm a 320 μm , el 20 al 65 % en peso, preferentemente el 30 al 52 % en peso y especialmente 42 a 46 % en peso de partículas con un tamaño de grano de 330 μm a 380 μm , y el 15 al 62 % en peso, preferentemente el 25 al 42 % en peso, y especialmente el 29 al 33 % en peso de 10 partículas con un tamaño de grano de 390 μm a 425 μm .

11. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizado porque la mezcla de 15 partículas de sal común está compuesta por el 1 al 15 % en peso, preferentemente el 4 al 12 % en peso y especialmente el 7 al 9 % en peso de partículas con un tamaño de grano de 108 μm a 140 μm , el 1 al 11 % en peso, preferentemente el 3 al 9 % en peso y especialmente el 5 al 7 % en peso de partículas con un tamaño de grano de 145 μm a 180 μm , el 3 al 21 % en peso, preferentemente el 7 al 17 % en peso y especialmente el 10 al 14 % en peso de partículas con 20 un tamaño de grano de 185 μm a 220 μm , el 1 al 11 % en peso, preferentemente el 3 al 9 % en peso y especialmente el 5 al 7 % en peso de partículas con un tamaño de grano de 225 μm a 250 μm , el 15 al 50 % en peso, preferentemente el 18 al 42 % en peso y especialmente el 22 al 28 % en peso de partículas con un tamaño de grano de 250 μm a 320 μm , el 15 al 50 % en peso, preferentemente el 18 al 42 % en peso y especialmente el 22 al 28 % en peso de partículas con un tamaño de grano de 330 μm a 380 μm , y el 5 al 29 % en peso, preferentemente el 10 al 24 % en peso y especialmente el 15 al 19 % en peso de partículas con 25 un tamaño de grano de 390 μm a 425 μm .

12. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 9 a 11, caracterizado 30 porque la mezcla de partículas de polímero está compuesta por el 5 al 50 % en peso, preferentemente el 10 al 30 % en peso y especialmente el 14 al 18 % en peso de partículas con un tamaño de grano de 108 μm a 140 μm , el 10 al 55 % en peso, preferentemente el 15 al 40 % en peso y especialmente el 20 al 24 % en peso de partículas con un tamaño de grano de 145 μm a 180 μm , el 18 al 88 % en peso, preferentemente el 32 al 76 % en peso y especialmente el 43 al 49 % en peso de partículas con un tamaño de grano de 185 μm a 220 μm , y el 5 al 45 % en peso, preferentemente el 10 al 28 % en peso y especialmente el 14 al 18 % en peso de partículas con un tamaño de grano de 225 μm a 250 μm .

13. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 9 a 12, caracterizado 35 porque la relación de pesos entre las partículas de polímero y las partículas de sal común es de

1:100 a 1:10, ventajosamente de 1:50 a 1:15 y especialmente de 1:20 a 1:18.

14. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 9 a 13, caracterizado porque antes de la compactación se agrega a la mezcla de partículas de polímero y partículas de sal común una solución de polímeros y se elimina el disolvente.

5 15. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, caracterizado porque el disolvente disuelve el polímero pero no la sal.

16. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 15, caracterizado porque el disolvente es seleccionado entre acetona, acetato de etilo, cloruro de metileno, cloroformo, hexafluoroisopropanol, hidrocarburos clorados y fluorados, alifáticos y aromáticos, 10 tetrahidrofurano, etilmethylcetona, dietilcetona, y mezclas de estos.

10 17. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 15, caracterizado porque el polímero es poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico) o poli(ácido glicólico–ácido láctico) y el disolvente es cloroformo.

15 18. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 14 a 17, caracterizado porque la relación de pesos entre las partículas de polímero y el polímero disuelto es de 10:1 a 1:100, ventajosamente de 2:1 a 1:25 y especialmente 1:1 a 1:10.

19. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizado porque la compactación se realiza por la acción de presión.

20 20. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizado porque para eliminar la sal común por disolución se deja actuar agua sobre la mezcla compactada.

21. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 20, caracterizado porque se elimina de nuevo el agua.

25 22. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizado porque la mezcla compactada se almacena primero en una atmósfera de CO₂ y luego se retira la sal común por disolución.

23. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el equivalente de tejido comprende células de tejido de por lo menos dos tipos celulares, en donde las células del primer tipo celular son hepatocitos y las células del segundo tipo celular son células de los islotes de Langerhans.

30 24. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 23, caracterizado porque la relación entre hepatocitos y células de los islotes de Langerhans es de aprox. 10⁶:3000.

25 25. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 23, caracterizado porque la relación entre hepatocitos y células de los islotes de Langerhans es de aprox. 10⁶:3–200, ventajosamente de aprox. 10⁶:10–100, especialmente de aprox. 10⁶:20–80, y más preferentemente de aprox. 10⁶:35–45.