

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 809 457**

51 Int. Cl.:

<b>A61L 27/26</b>	(2006.01)
<b>A61L 27/52</b>	(2006.01)
<b>A61L 27/54</b>	(2006.01)
<b>A61L 27/36</b>	(2006.01)
<b>A61L 27/38</b>	(2006.01)
<b>A61L 27/46</b>	(2006.01)
<b>A61L 27/48</b>	(2006.01)
<b>B33Y 10/00</b>	(2015.01)
<b>B33Y 70/00</b>	(2010.01)
<b>B33Y 30/00</b>	(2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.12.2015 PCT/EP2015/079502**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **16.06.2016 WO16092106**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.12.2015 E 15817126 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2020 EP 3230044**

54 Título: **Matriz de soporte de injerto para reparación de cartílago y procedimiento de obtención de la misma**

30 Prioridad:

**11.12.2014 EP 14197449**  
**09.03.2015 EP 15158224**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**04.03.2021**

73 Titular/es:

**ETH ZÜRICH (100.0%)**  
**Rämistrasse 101**  
**8092 Zürich, CH**

72 Inventor/es:

**KESTI, MATTI;**  
**ZENOBI-WONG, MARCY y**  
**MÜLLER, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 809 457 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Matriz de soporte de injerto para reparación de cartílago y procedimiento de obtención de la misma

La presente invención se refiere a un injerto tridimensional, particularmente para reparación de elementos craneofaciales y articulaciones lesionadas, y a un procedimiento de producción de injertos específicos para pacientes usando modelación asistida por ordenador y bioimpresión tridimensional con tintas biocompatibles.

### Antecedentes

La reconstrucción de la nariz y el oído externo de manera específica para un paciente son algunos de los más grandes desafíos en la cirugía plástica debido a las complejas propiedades tridimensionales de la estructura del cartílago interno con propiedades mecánicas que cambian regionalmente y superposición de piel. La reconstrucción auricular es aplicable a deformidades congénitas, microtia, sacrificio tisular relacionado con melanoma y lesiones, que incluyen accidentes y quemaduras graves. Las orejas están involucradas en aproximadamente 90% de las quemaduras que involucran la cabeza y el cuello. El tratamiento estándar usado con mayor frecuencia para la reconstrucción auricular total en los Estados Unidos y la Unión Europea está basado en una técnica quirúrgica de dos a tres etapas que usa cartílago costal autólogo recogido de la sexta, séptima y octava costilla esculpido con una forma similar a la oreja en la medida de lo posible por la cantidad limitada de tejido recogido. Generalmente, es alcanzada una cantidad suficiente de cartílago costal a los 10 años, lo que retrasa la cirugía reconstructiva. Otro procedimiento de reconstrucción para la cirugía reconstructiva de la oreja es el uso de implantes de silicona para evitar la necesidad de recolección de cartílago costal. Sin embargo, la colocación de una matriz de soporte acelular debajo de una capa fina de piel expone al paciente a un alto riesgo de complicaciones a largo plazo. Además, es imposible proporcionar un tamaño y una forma personalizados para cada paciente, y la oreja reconstruida no crece como la oreja contralateral, lo que lleva a asimetría. Las estrategias de reconstrucción disponibles implican diversas cirugías y su resultado depende en gran medida de la experiencia del cirujano reconstructivo. La morbilidad del lado del donante, el colapso de la pared abdominal debido a la falta de soporte del cartílago costal y el dolor intenso relacionado con la recolección del cartílago costal son complicaciones comunes. Además, existe una gran necesidad clínica de reparación de las lesiones osteocondrales, que ocurren como resultado de lesiones deportivas, traumatismos y enfermedades degenerativas tal como la osteoartritis. Las metodologías actuales de tratamiento implican el trasplante de injertos osteocondrales, que son autólogos o derivados de bancos óseos. Este tratamiento tiene diversas desventajas, que incluyen la morbilidad del sitio donante, la escasez de tejido donante, la dificultad quirúrgica y el hecho de que el injerto consiste en múltiples piezas, cada una de las cuales se puede aflojar o estar mal ubicada con relación a la altura.

El documento AU 2013 204 780 describe una formulación adecuada para la suspensión estable de células viables para formar una biotinta para la deposición controlada de dichas células en un patrón 2D o 3D. La formulación comprende una suspensión acuosa de microgel de uno o más biopolímeros de gelificación, preferentemente goma gellan, una o más sales adecuadas y células viables.

En vista del estado de la técnica actual, el objeto de la presente invención es proporcionar procedimientos y medios para proporcionar injertos específicos del paciente que mejoren las deficiencias del estado de la técnica mencionadas anteriormente. Este objeto es alcanzado mediante el tópicos de las reivindicaciones de la presente memoria descriptiva.

### Sumario

El alcance de esta invención está definido por las reivindicaciones. Las realizaciones en la descripción relacionadas con los procedimientos de tratamiento no están cubiertas por las reivindicaciones. Cualquier "realización" o "ejemplo" desvelado en la descripción pero que no esté cubierta por las reivindicaciones debe ser considerado presentado únicamente con fines ilustrativos.

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, un procedimiento de proporción de una matriz de soporte de injerto, en particular para uso en un paciente humano, comprende las etapas de:

- proporcionar partículas y/o fibras;
- proporcionar una solución acuosa de un polisacárido de gelificación;
- proporcionar células de mamífero;
- mezclar dichas partículas y/o fibras, dicha solución acuosa de un polisacárido de gelificación y dichas células de mamífero para obtener una mezcla de impresión;
- depositar dicha mezcla de impresión en una forma tridimensional, en el que dicho polisacárido de gelificación es goma gellan, goma gellan acilada y/o sulfatada, y en la que dicha mezcla de impresión comprende 3% o 3,5% (p/v) de dicho polisacárido de gelificación, y en el que dicha solución de un polisacárido de gelificación además comprende alginato.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, es proporcionado un injerto obtenido u obtenible por uno cualquiera de

los aspectos precedentes de la invención, o una cualquiera de sus realizaciones específicas, particularmente para uso en un procedimiento para reparación craneofacial o articular.

5 También es descrito en la presente memoria un procedimiento de reparación craneofacial o articular que comprende el modelo informático del injerto específico del paciente modificado para fabricación aditiva tridimensional con mezcla de impresión específica de cartílago que comprende al menos un polímero citocompatible, al menos uno de tejido troceado u otra partícula y células aditivas, la reticulación es proporcionada por una reacción espontánea o activada externamente de grupos reactivos y moléculas incrustadas en el material coextrudido o internamente en la biotinta, al menos uno de estos tipos está presente en al menos uno del polímero, tejido troceado y células para reconstruir cartílago funcional y nativo como injertos de tejido.

10 También es descrito en la presente memoria un procedimiento para crear gradientes internos de polímeros, regiones de porosidad y soporte para injertos mejor adaptados para la carga mecánica del injerto de tejido fabricado por procedimiento de fabricación aditiva.

15 Otra realización descrita en la presente memoria es un procedimiento de creación de estructuras de soporte externas sacrificiales para ayudar en la impresión de elementos sobresalientes de injertos, en el que el polímero sacrificial es codepositado con la mezcla de impresión y funciona como un depósito de iniciadores de reticulación para polimerizar la mezcla de impresión y es retirado después de la polimerización.

### **Descripción detallada de la invención**

Un primer aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de proporción de una matriz de soporte de injerto, en particular en un paciente humano, que comprende las etapas de:

- 20 - proporcionar una solución acuosa de un polisacárido de gelificación;
- proporcionar al menos uno de:
- o partículas y/o fibras;
  - o células de mamífero;
- 25 - mezclar dichas partículas y/o fibras, dicha solución acuosa de un polisacárido de gelificación y dichas células de mamífero para obtener una mezcla de impresión;
- depositar dicha mezcla de impresión en una forma tridimensional, en el que dicho polisacárido de gelificación es goma gellan, goma gellan acilada y/o sulfatada, y en el que dicha mezcla de impresión comprende 3% o 3,5% (p/v) de dicho polisacárido de gelificación, y en el que dicha solución de un polisacárido de gelificación además comprende alginato.

30 En ciertas realizaciones, la mezcla de impresión comprende una solución acuosa de un polisacárido de gelificación y partículas. En ciertas realizaciones, la mezcla de impresión comprende una solución acuosa de un polisacárido de gelificación y fibras.

Las fibras y/o partículas, particularmente cuando son derivadas del tejido cartilaginoso, pueden comprender factores que ayudan a apoyar el crecimiento de células dentro del injerto.

35 En ciertas realizaciones, la mezcla de impresión comprende una solución acuosa de un polisacárido de gelificación y partículas y fibras.

40 En ciertas realizaciones, la mezcla de impresión comprende una solución acuosa de un polisacárido de gelificación y células. En ciertas realizaciones, la mezcla de impresión comprende una solución acuosa de un polisacárido de gelificación y células y uno o varios factores de crecimiento. Inesperadamente, los inventores de la presente han descubierto que incluso en ausencia de partículas o fibras cartilaginosas, la provisión de material de gelificación y células puede ser suficiente, particularmente en presencia de factores de crecimiento, para mantener la viabilidad y proliferación celular.

45 En ciertas realizaciones, la mezcla de impresión comprende una solución acuosa de un polisacárido de gelificación y partículas y células. En ciertas realizaciones, la mezcla de impresión comprende una solución acuosa de un polisacárido de gelificación y partículas y fibras y células.

50 En ciertas realizaciones, dichas partículas consisten en, o comprenden, partículas de tejido. En ciertas realizaciones, dichas partículas consisten en, o comprenden, partículas de cartílago. En ciertas realizaciones, dichas partículas consisten en, o comprenden, partículas que consisten en tejido de cartílago liofilizado. En ciertas realizaciones, dichas partículas consisten en, o comprenden, tejido de cartílago humano. En ciertas realizaciones preferentes, dichas partículas consisten en, o comprenden, tejido de cartílago autólogo. En ciertas realizaciones preferentes, las partículas pueden ser productos clínicos de matriz micronizada que incluye partículas de BioCartilage, Amniofix, Alloderm-Cymetra, Cook Biotech Small Intestinal Muscosa (SIS). En ciertas realizaciones preferentes, las partículas pueden ser

hidroxiapatita o fosfato de calcio.

- 5 En ciertas realizaciones, las partículas y/o fibras están fabricadas con un polímero sintético, particularmente un polímero seleccionado del grupo que consiste en polímeros, o polímeros derivados de polietilenglicol, polipropilenglicol, poloxámeros formadores de gel F108, F127, F68, F88, polioxazolinas, polietilenimina, alcohol polivinílico, acetato de polivinilo, polimetilviniléter-anhídrido co-maleico, poliláctido, poli-N-isopropilacrilamida, ácido poliglicólico, polimetilmetacrilato, poliácridamida, ácido poliacrílico y polialilamina o copolímeros de estos o copolímeros en bloque de estos.
- 10 En ciertas realizaciones, las partículas y/o fibras comprenden o están predominante o exclusivamente compuestas por tejido troceado. En ciertas realizaciones, el tejido troceado es derivado del tejido seleccionado del grupo que consiste en cartílago auricular, cartílago nasal, núcleo pulposo, menisco, tráquea, cartílago nasal, cartílago de costillas, cartílago articular, líquido sinovial, humor vítreo, cerebro, médula espinal, músculo, tejidos conectivos, submucosa del intestino delgado e hígado. En ciertas realizaciones, el tejido troceado está en el intervalo de 5  $\mu\text{m}$  - 50  $\mu\text{m}$ , 50 - 200  $\mu\text{m}$  y 200 - 1000  $\mu\text{m}$  o una combinación de estos.
- 15 De acuerdo con la invención reivindicada, dicho polisacárido de gelificación es goma gellan, goma gellan acilada y/o sulfatada. En realizaciones de referencia, dicho polisacárido de gelificación se selecciona de goma guar, goma cassia, goma konjac, goma arábica, goma ghatti, goma de algarroba, goma xantana, sulfato de goma xantana, carragenina, sulfato de carragenina o una mezcla de cualquiera de los polisacáridos de gelificación anteriores.
- 20 En ciertas realizaciones, dicha solución de un polisacárido de gelificación comprende un polímero citocompatible como aditivo además del polisacárido de gelificación. De acuerdo con la presente invención, este polímero citocompatible es alginato. En realizaciones de referencia, el polímero citocompatible se selecciona del grupo que consiste en sulfato de alginato, sulfato de gellan, carragenina, sulfato de carragenina, goma guar, goma cassia, goma konjac, goma arábica, goma ghatti, goma de algarroba, goma xantana, sulfato de goma xantana, heparina, fibrina, sulfato de heparina, elastina, tropoelastina, sulfato de condroitina, sulfato de dermatán, ácido hialurónico, sulfato de hialuronano, celulosa, dextrano, sulfato de dextrano, poli-L-lisina, quitosano, seda y colágeno.
- 25 La goma gellan es un polisacárido soluble en agua producido por la bacteria *Pseudomonas elodea*. La unidad de repetición del polímero es un tetrasacárido, que consiste en dos residuos de D-glucosa y uno de cada residuo de L-ramnosa y ácido D-glucurónico. La repetición tiene la siguiente estructura: [D-[D-Glc( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)7D-GlcA( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)D]hbn-Glc( $\beta$ 877 $\rightarrow$ u8ir)L-Rha( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3)]<sub>n</sub>.
- 30 "Goma gellan acilada" es un término conocido en la técnica y se refiere a gellan que comprende acetilo en algunas o todas las posiciones de oxígeno 5' y ácido glicerílico en algunas de todas las posiciones de oxígeno 2' de la unidad de glucosa. Ver Fig. 8: Gellan acilado (A) es un gellan de producto crudo después de la fermentación bacteriana y cuando se purifica, se pueden escindir las cadenas laterales de acilo y glicerilo (B). Esto mejora la gelificación y se puede lograr una rigidez diferente. Ciertas realizaciones de la presente invención combinan gellan acilado y purificado para lograr una mejor flexibilidad para las estructuras.
- 35 En ciertas realizaciones, la solución de un polisacárido de gelificación comprende goma gellan o goma gellan acetilada, o un producto de sulfatación de goma gellan acilada, como el polisacárido de gelificación, y alginato como un aditivo polimérico citocompatible.
- En ciertas realizaciones, es añadida una solución acuosa de una sal que comprende cationes monovalentes, divalentes y/o trivalentes a dicho polisacárido de gelificación para efectuar la gelificación.
- 40 En ciertas realizaciones, dicha solución acuosa comprende entre 10 y 150 mmol/l de iones divalentes. En ciertas realizaciones, dicha solución acuosa comprende iones de estroncio ( $\text{Sr}^{2+}$ ). En ciertas realizaciones, dicha solución acuosa comprende iones de bario ( $\text{Ba}^{2+}$ ). En ciertas realizaciones, dicha solución acuosa comprende iones de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ).
- 45 En ciertas realizaciones, dicha solución acuosa comprende un total de entre 10 y 150 mmol/l de iones divalentes. En ciertas realizaciones, dicha solución acuosa comprende entre 10 y 150 mmol/l de iones de estroncio ( $\text{Sr}^{2+}$ ), particularmente entre 15 y 50 mmol/l  $\text{Sr}^{2+}$ . En ciertas realizaciones, dicha solución acuosa comprende entre 10 y 150 mmol/l de iones de bario ( $\text{Ba}^{2+}$ ), particularmente entre 15 y 50 mmol/l  $\text{Ba}^{2+}$ . En ciertas realizaciones, dicha solución acuosa comprende entre 10 y 150 mmol/l de iones de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), particularmente entre 15 y 100 mmol/l  $\text{Ca}^{2+}$ .
- 50 En ciertas realizaciones, dicha solución acuosa comprende un total de entre 10 y 150 mmol/l de  $\text{Sr}^{2+}$  y  $\text{Ba}^{2+}$ , particularmente entre 15 y 50 mmol/l de  $\text{Sr}^{2+}$  y  $\text{Ba}^{2+}$ . En ciertas realizaciones, dicha solución acuosa comprende un total de entre 10 y 150 mmol/l de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Ba}^{2+}$ , particularmente entre 15 y 50 mmol/l de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Ba}^{2+}$ . En ciertas realizaciones, dicha solución acuosa comprende un total de entre 10 y 150 mmol/l de  $\text{Sr}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , particularmente entre 15 y 50 mmol/l de  $\text{Sr}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$ .
- 55 En ciertas realizaciones, dicha solución de un polisacárido de gelificación comprende un azúcar monosacárido o azúcar disacárido, particularmente glucosa, manosa o arabinosa, con osmolaridad fisiológica. Esta adición puede ser importante para salvaguardar la viabilidad de las celdas incrustadas en la mezcla de impresión.

En ciertas realizaciones, dichas partículas y/o fibras consisten en, o comprenden,

- un polímero biocompatible o citocompatible, y/o
- un polímero biorreabsorbible, particularmente un polímero seleccionado del grupo que consiste en PLA (ácido poliláctico o poliláctido), DL-PLA (poli(DL-láctido)), L-PLA (poli(L-láctido)), polietilenglicol (PEG), PGA (poliglicólido), PCL (poli-ε-caprolactona), PLCL (polilactida-co-ε-caprolactona), ácido dihidrolipoico (DHLLA), alginato y quitosano, y/o,
- un polímero sintético, particularmente un polímero seleccionado del grupo que consiste en polímeros o polímeros derivados de polietilenglicol, polipropilenglicol, polaxómeros, polioxazolin, polietilenimina, alcohol polivinílico, acetato de polivinilo, polimetilviniléter-anhídrido co-maleico, poliláctido, poli-N -isopropilacrilamida, ácido poliglicólico, polimetilmetacrilato, poli(acrilamida), ácido poli(acrílico) y polialilamina.
- fibras naturales, particularmente seleccionadas de elastina, resilina y seda y sus derivados;
- un material conductor biocompatible, particularmente metal de transición de tántalo y polipirrol de polímero conductor (PPy).

En ciertas realizaciones, las partículas son formadas a partir de un biopolímero mencionado anteriormente en emulsión de aceite o por precipitación. En ciertas realizaciones específicas, dicho biopolímero es alginato. En ciertas realizaciones, dichas partículas de tejido son derivadas del tejido seleccionado del grupo que consiste en cartílago auricular, cartílago nasal, núcleo pulposo, menisco, tráquea, cartílago nasal, cartílago de costillas, cartílago articular, líquido sinovial, humor vítreo, cerebro, médula espinal, músculo, tejidos conectivos, submucosa del intestino delgado e hígado.

En ciertas realizaciones, el polisacárido de gelificación es goma gellan de grado de acilación variable, particularmente acilación que oscila entre 100% a 10% de acilación, 100% es alta, y comprende alginato como aditivo.

En ciertas realizaciones, ≥90%, ≥95% o ≥98% de dichas partículas están en el intervalo de 5 μm - 1000 μm,

Particularmente de 5 μm a 50 μm, 5 μm a 200 μm, 50 μm - 200 μm o 200 μm a 1000 μm.

En ciertas realizaciones, dichas fibras tiene un tamaño en el intervalo de 5 μm - 50 μm y 50 - 500 μm de longitud, con un aspecto de relación que oscila entre 2-1000, particularmente un intervalo de aspecto de 10 - 500, más particularmente 100 - 500, 100 - 1000, 200 - 1000 o de 500 a 1000. En ciertas realizaciones, son usadas fibras de seda con un diámetro de 1 μm o menor, y una longitud de 500 a 1000 μm o mayor. La relación de aspecto para el uso del término en el contexto de la presente memoria descriptiva está definida como la relación entre la longitud de la fibra y el diámetro.

En ciertas realizaciones, dichas células de mamífero son células de cartílago, células precursoras de cartílago o células madre con capacidad de diferenciación en células precursoras de cartílago o células de cartílago.

En ciertas realizaciones, las células de mamífero son seleccionadas del grupo que consiste en condrocitos autólogos primarios, condrocitos alogénicos primarios, células condroprogenitoras, condroblastos, células madre mesenquimáticas, células madre pluripotentes inducidas y células madre derivadas adiposas.

En ciertas realizaciones, la mezcla de impresión comprende:

- 1 - 6% (p/v), en particular aproximadamente 3% (p/v) de dicho polisacárido de gelificación;
- 0,5 - 10% (p/v), en particular aproximadamente 4% (p/v) de dichas partículas,
- opcionalmente, 0,5 - 8% (p/v), en particular aproximadamente 2% (p/v) de dicho aditivo.

En ciertas realizaciones, la mezcla de impresión comprende:

- aproximadamente 3% (p/v) de goma gellan;
- aproximadamente 4% (p/v) de partículas de tejido cartilaginoso,
- aproximadamente 2% (p/v) de alginato, 10 ng/ml TGBF3
- 10<sup>6</sup> a 10<sup>7</sup> de células de cartílago por ml.

En ciertas realizaciones, la mezcla de impresión es depositada junto con un polímero sacrificial. Esto permite la generación de estructuras sobresalientes, tales como las que son especialmente importantes para dar forma a ciertas características de la nariz y la oreja.

En ciertas realizaciones, la mezcla de impresión es depositada sobre una matriz de soporte de polímero sacrificial.

- En ciertas realizaciones, la matriz de soporte de polímero sacrificial es codepositada con la mezcla de impresión.
- En ciertas realizaciones, la mezcla y/o matriz de soporte de polímero sacrificial comprende cationes divalentes u otros agentes de gelificación/polimerización.
- 5 Mediante la difusión desde la mezcla polimérica sacrificial, hacia la mezcla de impresión, estos cationes u otros agentes de gelificación/polimerización permiten una rápida formación de la estructura tridimensional de la matriz de soporte.
- En ciertas realizaciones, la forma tridimensional y/o dicho polímero sacrificial es derivada por procedimientos de impresión en 3-D, particularmente sobre la base de un modelo informático tridimensional de un órgano contralateral de dicho paciente.
- 10 En ciertas realizaciones, el modelo tridimensional es obtenido mediante tomografía computarizada, imágenes de resonancia magnética, barrido por láser o usando cámaras tridimensionales.
- En ciertas realizaciones, el modelo informático está creado para soportar la carga en los gradientes y para crear estructuras internas para una mejor supervivencia y porosidad celular.
- En ciertas realizaciones, la matriz de soporte de polímero está derivada por procedimientos de fabricación aditiva.
- 15 En ciertas realizaciones, el procedimiento de fabricación aditiva es la impresión por chorro de tinta, bioimpresión, impresión por extrusión o procedimiento capa por capa.
- En ciertas realizaciones, la matriz de soporte de polímero está caracterizada por gradientes internos de polímero, porosidad y regiones de soporte.
- 20 En ciertas realizaciones, son añadidos polímeros adicionales para aumentar la viscosidad líquida de la matriz de modo que la tinta se pueda extrudir de manera consistente y no resulte bloqueada debido a los fenómenos de presión del filtro.
- En ciertas realizaciones, el polímero sacrificial es eliminado antes o después de dicha etapa de cultivo celular.
- En ciertas realizaciones, las partículas de tejido y/o biotinta comprenden un factor de crecimiento o una combinación de factores de crecimiento, particularmente seleccionados de BMP-2, BMP-7, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, y/o FGF-2, y/o factores mitogénicos, particularmente IGF-1, para promover la curación y la regeneración.
- 25 En ciertas realizaciones, los factores de crecimiento pueden ser cargados directamente en la mezcla de biotinta. En ciertas realizaciones, la concentración de dicho factor de crecimiento está en el intervalo de 0,1-5 mg/ml, 5-50 ng/ml o 50-500 ng/ml de un factor de crecimiento o una combinación de varios factores de crecimiento. En ciertas realizaciones, los factores de crecimiento son seleccionados de BMP-2, BMP-7, TGF- $\beta$ 1, 2, 3, IGF-1 y/o FGF-2.
- 30 En ciertas realizaciones, la mezcla de impresión, particularmente las partículas, comprende componentes adicionales, particularmente componentes seleccionados de factores de crecimiento, antioxidantes, citoquinas, fármacos y productos biológicos.
- En ciertas realizaciones, el polímero sacrificial incluye un agente para iniciar la reticulación, dicho agente es un catión monovalente, divalente y trivalente, enzima, peróxido de hidrógeno, peroxidasa de rábano picante, monómeros polimerizables por radiación tales como fenil-2,4,6 -trimetilbenzoilfosfinato de litio.
- 35 En ciertas realizaciones, los grupos iniciadores de la reticulación están presentes en la mezcla de impresión, particularmente seleccionados de los grupos que participan en la exposición a la luz, reticulación mediada por cationes y reticulación mediada por enzimas.
- Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a un procedimiento de proporción de una reparación de injerto, que comprende las etapas de:
- 40
- proporcionar una matriz de soporte de injerto mediante el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, y
  - depositar dicha matriz de soporte libre de células en un medio de cultivo celular que comprende células de mamífero, particularmente células de cartílago, células madre o células precursoras de cartílago, en una etapa
- 45 de cultivo celular.
- Otro aspecto de la invención se refiere a una matriz de soporte de injerto obtenible por, u obtenida por, el procedimiento de acuerdo con uno cualquiera de los procedimientos precedentes de la invención, o cualquier realización específica o combinación de características proporcionadas por las realizaciones específicas. La presente invención proporciona injertos reconstructivos craneofaciales específicos del paciente producidos por procedimientos de fabricación aditiva.
- 50 El injerto de tejido de cartílago elimina la necesidad de recoger cartílago, lo que disminuye la incomodidad del paciente,

reduce el tiempo quirúrgico y permite una mejor replicación de la forma, el tamaño y flexibilidad mecánica. Además, se puede lograr una regeneración tisular más rápida y un aumento de la proliferación celular para mejorar la recuperación quirúrgica. Para aplicaciones craneofaciales, esta técnica se puede combinar con el tratamiento de aumento de piel usado actualmente (es decir, expansores) u otros injertos de piel naturales o sintéticos.

## 5 **Impresión**

De acuerdo con la presente invención, los injertos auriculares y nasales específicos del paciente son producidos en base a los modelos barridos tridimensionalmente del paciente mediante el uso de procedimientos de fabricación aditiva tal como, pero sin limitación, impresión por extrusión, impresión por inyección de tinta y otros procedimientos de deposición capa por capa. La tomografía computada clínica (CT), imágenes de resonancia magnética (MRI) u otras herramientas de obtención de imágenes tridimensionales, tal como barredores láser, cámaras 3D o sus combinaciones, se usan para producir el modelo computado del implante específico del paciente. Para la reconstrucción de la oreja, la imagen puede ser reflejada para producir un modelo computacional que imita con precisión la oreja contralateral para la producción de injerto de tejido. Para la reconstrucción de la oreja y la nariz, puede ser usada una biblioteca de modelos de injerto para proporcionar una selección de injertos al paciente, especialmente en un caso en el que no pueda ser realizado un barrido contralateral normal. Estos procedimientos pueden llevar a mejores resultados cosméticos y estéticos cuando son usadas herramientas específicas de reducción de tamaño para reducir las dimensiones de la estructura del cartílago por el grosor de la capa de piel para lograr un injerto final del tamaño correcto. Pueden ser usados procedimientos de fabricación aditiva en la creación de estas construcciones con alta precisión y en condiciones estériles. Además, las estructuras de soporte interno y la porosidad para la supervivencia celular en construcciones grandes pueden ser añadidas en una forma y/o rigidez específica de acuerdo con el paciente, de acuerdo con las necesidades del paciente. El cartílago avascularizado puede ser diseñado para alojar estructuras vasculares para colocar sobre la piel y otros tejidos en su proximidad para prevenir la necrosis. La estructura de cartílago impreso puede ser usada como molde bioactivo para la construcción de tejidos suprayacentes, liberación de factores de crecimiento y otras moléculas secretoras para mejorar la viabilidad de las células vecinas. Esta liberación puede ser diseñada especialmente al tener polímeros sulfatados en la mezcla para unir los factores de crecimiento a la proximidad de las células y liberar lentamente las moléculas.

En ciertas realizaciones, la forma 3D puede ser creada como un modelo informático para soportar la carga en los gradientes y crear estructuras internas para una mejor supervivencia y porosidad celular

## **Material**

El material de biotintas comprende al menos un polímero citocompatible y al menos una de partículas y células, la reticulación es provista por la reacción activada espontánea o externamente a partir de grupos reactivos y moléculas, está presente al menos uno de estos tipos en al menos uno del polímero, tejido troceado y células. Los polímeros citocompatibles (en adelante en la presente denominados "los polímeros") para uso en este procedimiento pueden ser cualquier polímero adecuado con la citocompatibilidad necesaria, es decir, su presencia no es perjudicial para las células. Pueden ser materiales naturales (biopolímeros) o sintéticos, o sus combinaciones. Los grupos reactivos necesarios que permiten la reticulación pueden estar ya presentes en los polímeros, o los polímeros pueden ser modificados para incluir tales grupos. De acuerdo con la invención, el alginato es usado como el polímero citocompatible. Otras realizaciones de referencia pueden incluir ejemplos no limitantes de polímeros naturales tal como sulfato de alginato, heparina, fibrina, sulfato de heparina, elastina, tropoelastina, sulfato de condroitina, sulfato de dermatán, ácido hialurónico, sulfato de hialuronano, celulosa, dextrano, sulfato de dextrano, poli-L-lisina, quitosano, gelatina, goma gellan de diversos grados de acilación, sulfato de gellan, goma guar, goma casia, goma konjac, goma arábica, goma ghatti, goma de algarroba, goma xantana, sulfato de goma xantana, carragenina, sulfato de carragenina, seda y colágeno de diferente tipo. Son incluidas todas las versiones sulfatadas de estos polímeros.

Los ejemplos típicos no limitantes de polímeros sintéticos incluyen, pero sin limitación, polímeros o polímeros derivados de polietilenglicol, polipropilenglicol, polaxómeros, polioxazolin, polietilenimina, alcohol polivinílico, acetato de polivinilo, polimetilviniléter- anhídrido co-maleico, poliláctido, poli N-isopropilacrilamida, ácido poliglicólico, polimetacrilato de metilo, poli(acrilamida), ácido poli(acrílico) y polialilamina.

Por "al menos uno" de los grupos que están presentes en al menos uno de los polímeros, partículas y células, se entiende que los grupos reactivos añadidos pueden estar presentes en todas o cualquiera de estas entidades.

Las partículas incorporadas a la solución de polímero pueden consistir en, pero sin limitación, partículas de tejido de matriz extracelular, microesferas cargadas o descargadas y fibras en un intervalo de tamaño entre 5 y 500 micrones.

## **Reticulación**

La formación de hidrogel basada en la combinación de materiales, partículas y células puede ser iniciada por numerosos factores o agentes, que incluyen, pero sin limitación, cationes mono, di, trivalentes, enzimas e iniciadores radicales. Adicionalmente, pueden ser empleados procedimientos físicos y físico-químicos, por ejemplo, tratamiento en solución de pH bajo o alto y diferentes regiones de temperatura durante el proceso de fabricación.

En ciertas realizaciones, cualquiera de dicha mezcla de impresión y dicha armazón de polímero comprende grupos

reactivos unidos covalentemente a la misma, particularmente grupos reactivos que facilitan la unión de dicha mezcla de impresión, o sus componentes constituyentes, a dichas partículas, mediante reticulación por reacción activada espontánea o externa, en la que los grupos reactivos están presentes en al menos uno de los polímeros, tejido troceado y células para reconstruir los cartílagos funcionales y nativos como los injertos de tejido.

## 5 **Partículas**

El tamaño del tejido troceado a ser usado puede ser de cualquier tamaño adecuado, pero en una realización particular, es de 5 micrones a 500 micrones, de modo que pueda ser extruido sin obstruir la unidad dispensadora, tal como una aguja o una válvula. El tejido troceado para uso en el procedimiento puede ser cualquier tejido adecuado, pero es ventajosamente un tejido de naturaleza similar o idéntica a la del cartílago. Los ejemplos ilustrativos y no limitantes de tejido adecuado incluyen cartilago articular, núcleo pulposo, menisco, tráquea, cartilago nasal, cartilago de costillas, cartilago de la oreja, liquido sinovial, cartilago traqueal, humor vítreo, cerebro, hígado, médula espinal, músculo, tejidos conectivos y grasa subcutánea, almohadilla de grasa intrapatelar, submucosa del intestino delgado. Un ejemplo particular es el tejido con alto contenido de elastina y glicosaminoglicano, los ejemplos particulares son cualquier tipo de cartilago, núcleo pulposo y menisco. El tejido puede ser troceado mediante cualquier procedimiento adecuado, los ejemplos de procedimientos no limitantes, incluyen homogenización, criomolienda, molienda en seco, corte, troceado, trituración y seccionamiento. El tejido puede estar sujeto a descelularización para eliminar los epítomos que pueden causar respuestas inflamatorias agudas y patógenos, que incluyen el VIH. Recientemente, los tejidos descelularizados, es decir, los tejidos en los que han sido destruidas las células y eliminados sus restos, han atraído el interés como alternativas de material de matriz a enfoques más simples en los que la matriz está compuesta por un material única (Hoshiba *et al.* "Decellularized matrices for tissue engineering". Expert Opinion on Biological Therapy. 2010;10:1717-28). La descelularización de tejidos da como resultado una matriz de soporte de matriz extracelular ideal para regeneración de tejido lesionado o enfermo, ya que conserva la arquitectura de alta resolución y las señales biológicas necesarias para la recapitulación de la función. La descelularización puede ser realizada, por ejemplo, usando detergentes, peróxido de hidrógeno, hidróxido de sodio y enzimas, ARNasa y ADNasa. Las partículas pueden ser fabricadas por procedimientos tal como, pero sin limitación, la formación de coloides por interacciones hidrófilas/hidrófobas, emulsiones de dos fases y en interfaces de aceite. Las fibras pueden ser fabricadas por procedimientos tal como, pero sin limitación, electrohilado, extrusión de fibra y extracción de fibra. Las partículas y fibras de cualquier tipo pueden ser troceadas mediante cualquier procedimiento adecuado, los procedimientos ilustrativos y no limitantes, incluyen homogenización, criomolienda, molienda en seco, corte, troceado, trituración y seccionamiento. Estas piezas de tejido, partículas y fibras aditivas se pueden modificar adicionalmente con grupos funcionales que se unen al polímero portador o combinación de estos materiales o tratar para exponer grupos reactivos para la reticulación. Además, se pueden cargar factores de crecimiento, antioxidantes y moléculas de fármacos en o sobre los polímeros, piezas de tejido, partículas y fibras añadidos.

## **Células**

El uso del término "células" en la presente descripción abarca no solo células individuales, particularmente células de mamífero, más particularmente células humanas, más particularmente células humanas autólogas, sino que también abarca aglomeraciones de las células descritas que forman esferoides, gránulos y microtejidos, que son bien conocidos y comúnmente usados en la técnica. Las células para uso en el procedimiento son ventajosamente células de un tipo similar a las presentes en el tejido del cartílago. Los ejemplos típicos no limitantes de tipos de células adecuadas incluyen condrocitos autólogos primarios, condrocitos alogénicos primarios, células condroprogenitoras, condroblastos, células madre mesenquimáticas, células madre pluripotentes inducidas y células madre derivadas de tejido adiposo, células madre derivadas de la cresta neural.

## **Material de la mezcla de impresión**

El término "mezcla de impresión" en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a una masa extrudida que comprende los componentes constituyentes clave:

- Partículas fabricadas con tejido o fibra natural (opcionalmente: seco), o fabricadas con polímero biocompatible, opcionalmente bioreabsorbible, o tanto polímero como tejido/fibra natural,
- Una solución acuosa de un polisacárido de gelificación, particularmente goma gellan o un derivado del mismo, y
- Células de mamífero.

La composición del material de la mezcla de impresión puede oscilar en un amplio intervalo, de acuerdo con la naturaleza de los materiales y el uso final. Los polímeros están típicamente presentes en una proporción en peso de 0,5 a 20%. Cuando el tejido troceado, partículas o fibras están presentes, típicamente están presentes en una proporción en peso de 10-40% de polímeros secos o igualmente 1-20% en peso total. Cuando las células están presentes, se usan típicamente en concentraciones de  $3 \times 10^5$  células/ml -  $50 \times 10^6$  células/ml.

Además de los componentes principales descritos anteriormente, el material reticulable puede incluir otros materiales, presentes para conferir propiedades particulares al material. Un ejemplo particular es la elastina, que es abundante en la ECM auricular y nasal para proporcionar la elasticidad del tejido y otros ejemplos incluyen factores de crecimiento,

citoquinas, medicamentos, productos biológicos, ARNsi, ADN, antioxidantes tales como polifenoles en las soluciones poliméricas, que podrían aumentar regeneración de los tejidos. Los factores de crecimiento añadidos pueden ser unidos a polímeros sulfatados o polímeros no modificados para mejorar la administración y eficacia en la proximidad de las células que residen en la mezcla de impresión.

- 5 El material de la mezcla de impresión en su forma lista para uso es un estado fácilmente gelificado térmicamente que puede ser aplicado fácilmente para tomar la forma deseada en el proceso de fabricación. Los polvos de las moléculas y el tejido troceado liofilizado, las partículas y las fibras pueden ser almacenados y esterilizados por separado. Todos los componentes pueden ser combinados antes del empaquetado o ser rehidratados justo antes del uso, de este modo son conservados los factores de crecimiento y las proteínas durante períodos de tiempo largos.

10 **Forma**

Los injertos de tejido específicos de un paciente son adaptados a cada paciente o pueden ser creados ciertos catálogos de modelos para situaciones en las que no se desea o no es posible obtener la imagen del paciente. El modelo tridimensional obtenido de los barridos externos de oreja y nariz puede ser modificado para contener estructuras de soporte interno, gradiente de polímeros para propiedades mecánicas versátiles y porosidad para un aumento de supervivencia celular en construcciones grandes. Además, la región puede ser adaptada en términos de rigidez, cóctel y concentración de factores de crecimiento, por ejemplo, para inducir variaciones regionales en la proliferación celular. Por ejemplo, la periferia del injerto de cartílago puede ser más porosa o más suave, lo que permite un mayor flujo de nutrientes hacia la estructura profunda. Además, la especificidad regional y los tipos de tejido se encuentran en estas construcciones, por ejemplo, en el lóbulo de grasa de la oreja es el tejido principal y es responsable de las propiedades mecánicas. Las propiedades regionales y las estructuras especificadas se pueden construir fácilmente de manera de capa por capa. En este enfoque en capas, el mecanismo de reticulación puede tener lugar no solo dentro de capas individuales, sino también entre capas adyacentes, de este modo forma una estructura continua completamente integrada. Esto se puede lograr mediante la iniciación de la reticulación en la periferia de la construcción en contacto con la estructura de soporte que contiene el depósito de la molécula reactiva.

25 **Soporte**

La estructura de soporte puede ser codepositada con el material de la mezcla de impresión para soportar estructuras sobresalientes, para iniciar la reticulación o para evitar el secado del material durante la deposición. El material de soporte puede contener factores de reticulación que incluyen, pero sin limitación, cationes mono, di, trivalentes, enzimas e iniciadores radicales. Además, pueden ser empleados procedimientos físicos y físico-químicos mediante interacciones de materiales de soporte para modificar el pH y la concentración de moléculas. Después de la fabricación de la construcción, se puede eluir la estructura de soporte. La elución se puede deber, pero sin limitación, al cambio de temperatura, cambio de pH o moléculas degradantes.

El resultado es una reparación de cartílago que es rápida, eficaz y duradera. La longevidad es un factor importante en el injerto para conservar las propiedades mecánicas hasta que haya sido lograda una producción suficiente de ECM de las células para producir una estructura similar a un cartílago nativo.

Los ejemplos típicos del uso al que puede ser aplicado el procedimiento de la presente divulgación incluyen:

- Reconstrucción de defectos craneofaciales;
- Relleno y reconstrucción de pérdida parcial de tejido y su integración con tejido nativo;
- Reconstrucción de tráquea (tubo aéreo), menisco o cartílago costal con injertos específicos de paciente;
- 40 - Relleno de defectos osteocondrales.

El procedimiento de la invención está caracterizado por las siguientes ventajas:

- Posibilidad de producir injertos de tejido específicos de un paciente para aplicaciones craneofaciales y ortopédicas tal como, pero sin limitación: oreja, nariz, cartílago articular.
- 45 - Posibilidad de ajustar las propiedades de flexión para que coincida la matriz de soporte con parámetros fisiológicos y regiones específicas del tejido nativo.
- Posibilidad de incluir regiones de soporte de carga funcionales de polímeros más compactos y estructuras reforzadas para adaptarse a las propiedades mecánicas del injerto.
- Proporción de una mejor satisfacción del paciente y disminución de los niveles de dolor debido a la eliminación de la necesidad de recolección de cartílago.
- 50 - Uso de tejido nativo autólogo, alogénico o xenogénico que ya contiene la disposición compleja de componentes de la matriz extracelular específicos del tejido en proporciones fisiológicamente exactas. Estas partículas son las principales responsables de las señales de proliferación que estimulan los condrocitos.

- Los fragmentos de tejido de cualquier partícula de ECM posible pueden ser incorporados en la mezcla de hidrogel para fines de fabricación aditiva para producir cualquier geometría deseada sin comprometer su composición bioquímica, lo que aumenta las perspectivas de bioimpresión de órganos.
- 5 - Posibilidad de incorporar factores terapéuticos dentro de la matriz de soporte que incluyen, pero sin limitación: compuestos farmacéuticos, factores de crecimiento, péptidos, proteínas, carbohidratos, y vectores de terapia génica. Además, pueden ser incluidas moléculas de direccionamiento que pueden inducir la migración de la célula huésped al almacén.
- Posibilidad de lograr la organización zonal de la arquitectura de los tejidos mediante la colocación de capas de diversos tejidos/composiciones usando técnicas de fabricación aditiva.

10 La descripción es descrita adicionalmente con referencia a las siguientes figuras y ejemplos no limitantes, que representan realizaciones particulares.

15 La Fig. 1 A) es el modelo tridimensional creado en base a los modelos de CT del paciente y después de que haya sido añadida la estructura de soporte interno para un mejor soporte de carga del injerto, B) una fotografía de una construcción de la oreja diseñada con tejido intacto, y C) una fotografía de soporte interno que puede estabilizar la estructura de la oreja para propiedades de flexión más naturales. Ambas imágenes B y C se fabricaron usando bioimpresión tridimensional y están compuestas por partículas de cartílago troceadas, goma gellan y alginato.

La Fig. 2 ilustra la cinética de reticulación reológica y la rigidez final de la biotinta con dos composiciones.

20 La Fig. 3 ilustra la dependencia del tiempo de las propiedades mecánicas con la solución de cloruro de estroncio 20 mM, en la que los especímenes (n = 6) de tensión de falla final promedio para cada punto de tiempo fueron medidos en tensión. Además, la concentración de cationes (negro = cloruro de calcio y gris = cloruro de estroncio) tiene un efecto similar en la reticulación a pesar de la fuente catiónica. Se puede concluir con que las propiedades mecánicas dependen en gran medida de la concentración de cationes y el tiempo de reticulación.

25 La Fig. 4 es un gráfico que ilustra la actividad metabólica de los condrocitos incrustados en el material de la mezcla de impresión en el proceso de impresión. Ensayo de actividad metabólica (el ensayo de una solución Promega MTS se realizó en varios puntos de tiempo analizados con un lector de placas (Synergy H1, Biotek). El control positivo fue alginato 1% (gris claro), el material de la mezcla de impresión corresponde al material de la mezcla de impresión sin partículas de tejido (gris) y el material de la mezcla de impresión + ECM (gris oscuro) consiste en partículas de matriz extracelular de cartílago <100 µm de diámetro. Todas las condiciones fueron analizadas por triplicado.

30 La Fig. 5 ilustra la estructura de soporte codepositada que proporciona moléculas de reticulación iniciales tales como cationes de cualquier fuente, enzima, proteína u otra molécula activadora que inicia la cascada de reticulación A) y la construcción final con elementos sobresalientes después de la elución del soporte B).

35 La Fig. 6 es una fotografía de una construcción nasal diseñada de tejido de tamaño nativo intacto que está compuesta de partículas, goma gellan y alginato. La construcción se fabricó usando bioimpresión tridimensional en menos de 17 minutos. El espacio entre las líneas representa 1 mm.

40 La Fig. 7 es una imagen de microscopía de campo brillante que muestra una orientación de fibra de PMMA de 10% en goma gellan 3% antes del corte (izquierda), después del corte uniaxial en dos direcciones de esquina a esquina (mitad) y después del corte vertical uniaxial. La barra de escala es de 50 micrones.

La Fig. 8 ilustra la composición de goma gellan de gellan de alta acilación (A) y gellan (B) no acilado.

La Fig. 9 ilustra la conversión del modelo tridimensional específico del paciente durante el proceso de impresión en injerto nasal diseñado por tejido de izquierda a derecha. El espacio entre las líneas representa 1 mm.

45 La Fig. 10 muestra los resultados de la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) de diversos grados de sulfatación en esqueletos de polímeros de A) alginato y B) goma gellan. La flecha en 1300 cm<sup>-1</sup> marca el pico de sulfatación. En grados superiores de sulfatación en el polímero aumenta la unión del factor de crecimiento, lo que lleva a una mejor administración de moléculas.

50 La Fig. 11 muestra el resultado de una caracterización reológica de las composiciones de biotinta con y sin partículas. El comportamiento pseudoplástico fue medido en rotación a), la recuperación por cizallamiento en la oscilación después de un cizallamiento de 1 segundo (velocidad de cizallamiento de 100 s) durante dos ciclos b), la biotinta sola fue reticulada iónicamente con varias condiciones de cationes c), y el módulo de almacenamiento máximo G' de las muestras reticuladas durante 30 minutos con SrCl<sub>2</sub> 20 mM d). Las barras de error representan la desviación estándar.

La Fig. 12 muestra el resultado de una determinación de las propiedades de tensión e hinchamiento de las

construcciones impresas. La prueba de tensión fue realizada en especímenes en forma de pesas impresas, en la que la vía de la boquilla es mostrada con líneas negras y la estructura impresa es mostrada después del hinchamiento a). Las curvas representativas de tensión-deformación en las que fue producida una falla en la región central de la muestra b). Comportamiento de hinchamiento de las composiciones de biotinta basadas en la ecuación (2) y (3) para evaluar la retención total de agua c) y retención de agua después de la reticulación d) respectivamente. Las divisiones más pequeñas en la regla son de 1 mm y las barras de error representan la desviación estándar.

La Fig. 13 muestra el resultado de una determinación de la viabilidad celular de las construcciones impresas y el ensayo de proliferación celular. La viabilidad tras la impresión de discos gruesos de una capa fue evaluada con tinción de células muertas live/dead a) en la que fue observado 80% de viabilidad 3 h después de la impresión, que fue recuperado a 97% en el día 4. Para evaluar la viabilidad en una estructura grande, fue impresa una nariz de tamaño de adulto joven y la viabilidad fue evaluada a partir de un corte central (distancia de difusión -5 mm) evaluada por tinción de células muertas live/dead. Fue observada una viabilidad celular de 60%. Barra de escala 5 mm (izquierda), y 50  $\mu$ m (derecha). Además, fue evaluado el número de células en discos moldeados con cuantificación de ADN c) donde se observó un aumento estadísticamente significativo en el ADN desde el día 1 hasta el día 21 con Biotinta+ partículas de cartílago y ambas composiciones suplementadas con TGF- $\beta$ 3. Las barras de error representan la desviación estándar y el nivel de significancia fue ( $p < 0,05$ ).

### Ejemplos

Cualquiera de los siguientes ejemplos que no está cubierto por el alcance de las reivindicaciones adjuntas, es presentado como un ejemplo de referencia.

#### **Ejemplo 1a: Bioimpresión de injertos de tejido específicos para el paciente**

Fueron realizadas imágenes clínicas de tomografía computada y fue obtenido el objeto tridimensional computacional resultante (Fig. 1). Luego, el modelo de oreja externo específico del paciente fue reflejado en el lado contralateral y fue generado un nuevo modelo 3D. Junto con el nuevo modelo, fue generado el modelo de estructura de soporte externo para soportar la estructura de la oreja, especialmente en las regiones sobresalientes durante la impresión. La estructura de soporte fue diseñada para estar en contacto con la tinta en los lugares estratégicamente importantes para iniciar la reticulación y para soportar los elementos sobresalientes (Fig. 5). Se demostró que la coextrusión del material de soporte conserva las líneas de biotinta horizontales sin pandeo y la forma impresa con exactitud después de la elución del soporte. Además, la estructura de soporte interno de polímeros más densos se preparó para permitir una mejor distribución de fuerza en la estructura interna (Fig. 2, 3). Todos los modelos fueron convertidos en código de máquina en convertidor STL (RegenHU) y transferidos a la bioimpresora (BioFactory, RegenHU) para el proceso de impresión.

Usando la misma técnica, los inventores de la presente han demostrado la impresión de diversas estructuras cartilaginosas que incluyen el menisco, los discos intervertebrales y la nariz. Los injertos de disco intervertebral de dos componentes se pueden imprimir con dos composiciones de biotinta que imitan el núcleo pulposo y el anillo fibroso.

#### **Ejemplo 1b: Producción de partículas de cartílago para fines de impresión tridimensional**

Fue recolectado cartílago del cartílago articular o auricular bovino fresco mediante la eliminación de capas finas de cartílago en una placa de Petri que contiene PBS y penicilina-estreptomycinina 1%. El cartílago recolectado fue transferido a un criomolino (Retsch) y fue molido durante tres ciclos con una intensidad de 30 Hz. El cartílago molido fue recogido y liofilizado para obtener polvo seco que puede ser tamizado en el intervalo de tamaño de partícula deseado. Estas partículas también pueden ser cargadas con factores de crecimiento u otras moléculas para mejorar la proliferación y otras respuestas celulares. Después de cargar las partículas, fueron liofilizadas y criopreservadas para maximizar la disponibilidad de biomoléculas para una vida útil prolongada.

#### **Ejemplo 1c: Preparación del material de la mezcla de impresión y el proceso de impresión**

El material de la mezcla de impresión ("Bio-tinta") fue producido mediante la combinación de goma gellan en una concentración de 3,5% con alginato 3%. La goma gellan fue dializada contra agua ultrapura para minimizar los residuos de cationes en el material. La diálisis fue realizada durante tres días en agua ultrapura a 70-80 °C con cambio de agua una o dos veces por día. El gellan fue liofilizado adicionalmente para obtener un polvo seco. La goma gellan purificada fue disuelta en agua desionizada que contiene glucosa, lo que hace más compatible con las células y fue añadida solución de alginato para obtener la concentración final de polímeros. La mezcla de polímeros fue mezclada con partículas de ECM y  $6 \times 10^6$  células/ml para obtener el material de la mezcla de impresión final. Este material de la mezcla de impresión estimuló la proliferación celular significativamente en comparación con el control positivo (Fig. 4). La producción de matriz extracelular de cartílago se evaluó con histología e inmunotinción después de 8 semanas en cultivo para Biotinta sola y Biotinta + ECM con y sin factor de crecimiento TGF- $\beta$ 3. La Biotinta + ECM sin factores de crecimiento estimuló la proliferación celular por encima de la Biotinta sola, lo que fue claramente visible en la tinción H&E. Las partículas Biotinta + Cartílago mostraron un ligero aumento en la tinción de azul Alcian y fue observada una ligera tinción de colágeno II, lo que sugiere la necesidad de una estimulación adicional del factor de crecimiento. A

menudo se observó que las células proliferaban alrededor de las partículas sin factor de crecimiento, mientras que las partículas Biotinta + Cartílago con TGF- $\beta$ 3 no tenían proliferación específica del sitio, lo que sugiere que las partículas son una fuente de factores de crecimiento mitogénicos. Después de 8 semanas, el aspecto macroscópico de los armazones sugirió que la estimulación del factor de crecimiento tenía un efecto claro en la producción de matriz de cartílago como se ve en el tamaño y el aspecto opaco de las muestras suplementadas con TGF- $\beta$ 3. Ambas composiciones de biotinta suplementadas mostraron un aumento significativo en los componentes de ECM de cartílago y tenían áreas que comenzaron a parecerse a la densidad celular y al contenido de GAG del cartílago nativo. Además, la deposición de colágeno II fue fuerte en todo el injerto en las condiciones suplementadas con factor de crecimiento, mientras que solo se observó tinción pericelular en las muestras cultivadas sin TGF- $\beta$ 3. El colágeno tipo I y la tinción con rojo de alizarina se realizaron para determinar la producción y la calcificación del fibrocartílago. Se halló colágeno I en partículas Biotinta + Cartílago y en ambas condiciones suplementadas con TGF- $\beta$ 3, lo que sugiere cierta producción de fibrocartílago, quizás debido al paso de las células. En todas las condiciones, la calcificación estuvo ausente, lo que sugiere que el fenotipo del cartílago de los condrocitos era estable.

El material de la mezcla de impresión fue impreso sobre un sustrato y el polímero de soporte Pluronic F127 fue coextrudido para llenar la capa posterior. Pluronic contenía 20 mM de  $\text{SrCl}_2$  para iniciar la reticulación de biotinta después del contacto con la tinta. Los cationes se difunden en el material de la mezcla de impresión debido al equilibrio osmótico y las fuerzas electrostáticas que iniciaron la reticulación. Las estructuras se generaron con agujas de 410  $\mu\text{m}$  y velocidad de alimentación de 800 mm/minuto. La presión aplicada a la jeringa de extrusión varió entre 1.2 - 1.4 bar. Después de la deposición capa por capa del material en la forma deseada, el soporte sacrificial Pluronic se eluyó en un baño de  $\text{SrCl}_2$  20 mM durante unos minutos antes de que la construcción se transfiriera al medio de cultivo celular a 37 °C. La Fig. 1 ilustra la estructura de soporte interno del cartílago de la oreja y la Fig. 6 muestra los injertos de nariz generados por esta técnica. La Fig. 2 ilustra que el módulo de almacenamiento inicial es de 100 kPa después de la reticulación, que es comparable a los hidrogeles de alta rigidez.

#### **Ejemplo 2: Composición de biotinta optimizada por sus propiedades mecánicas y retención del factor de crecimiento.**

Preparación de biotinta: fue añadido gellan a agua ultrapura que contiene D-glucosa (300 mM) a 90 °C para lograr una solución 3,5%, de los cuales 85% era goma gellan con bajo contenido de acilo y 25% era goma de gellan con alto contenido de acilo. Fue añadido alginato a la mezcla para lograr una solución 2,5%. El matraz de ebullición fue mantenido a 90 °C con agitación hasta que la solución fue homogénea, típicamente durante una hora. La solución homogénea se enfrió a 30 °C antes del mezclado celular. En pocas palabras, los condrocitos bovinos ( $4 \times 10^6$  células/ml) fueron mezclados en la solución de DMEM y añadidos a la biotinta en medio de cultivo en una relación de volumen de 1:10 para reticular previamente la biotinta. La mezcla fue realizada hasta que la solución alcanzó la temperatura ambiente y fueron cargadas las jeringas de impresión.

Las composiciones de la goma de gellan de alto contenido de acilo (GG-HA) y bajo contenido de acilo (GG-LA) (Fig. 8) contribuyen a la rigidez y la elasticidad de la biotinta final. Mediante la variación de la relación entre las formas de acilación, los materiales pueden ser reticulados más estrechamente, lo que produce una matriz más rígida mientras que mediante la ruptura del empaquetamiento estrecho de las cadenas de polímero en la reticulación se puede producir una matriz más elástica. Estos parámetros fueron óptimos para aplicaciones craneofaciales en una composición de 85% de GG-LA, 25% de GG-HA que proporciona propiedades de reticulación ajustables hasta 230 kPa de tensión final y una deformación promedio de 68% en la falla (Fig. 3). Para optimizar adicionalmente la retención del factor de crecimiento en la biotinta, se añadió una concentración de 2% de goma gellan sulfatada (GG-3%) a la biotinta (Fig. 8). Esta composición fue superior en la retención de los factores de crecimiento cargados, en este caso TGF- $\beta$ 3 y FGF-2, en la biotinta en comparación con la biotinta no sulfatada.

#### **Ejemplo 3: Material de impresión opcional y proceso de reticulación con material de soporte.**

Fueron mezclados polímero base gellan 3% con aditivo hialuronano conjugado con tiramina 3% para generar hidrogel reticulable enzimáticamente en presencia de peroxidasa de rábano picante (HRP) y peróxido de hidrógeno. Los materiales fueron disueltos en agua desionizada en presencia de glucosa monosacárido en osmolaridad fisiológica, específicamente 300 mM. Fueron añadidas partículas de hidroxiapatita en una concentración de 4% (p/v) a la mezcla de polímeros. Esta composición de biotinta se bioimpresió adicionalmente en presencia de HRP y peróxido de hidrógeno cuando se mezcló HRP con la biotinta con una concentración de 1 unidad/ml o con la mezcla de Pluronic F127 30% junto con el peróxido de hidrógeno en concentración de 0,0012%. La matriz de soporte construida capa por capa fue reticulada inmediatamente después del contacto con la estructura de soporte. La estructura de soporte fue eluida en el medio frío para disminuir los efectos negativos del peróxido de hidrógeno en presencia de las células. La estructura fue lavada varias veces después para minimizar la cantidad de residuos de peróxido de hidrógeno.

#### **Ejemplo 4: Materiales reforzados con fibra para bioimpresión**

Fue disuelto gellan 3% en agua desionizada y fueron añadidas fibras de metacrilato de polimetilo (PMMA) 10% (p/v) como fibras electrohiladas troceadas en la solución de gellan. Fueron tomadas imágenes de las fibras con microscopía electrónica de barrido para determinar que el diámetro de la fibra fuera de aproximadamente 2 micrones. Fue tomada una imagen del gellan reforzado con fibra antes de la cizalla (Fig. 7 a la izquierda) y después de dos orientaciones de

cizalla diferentes durante 2 minutos (Fig. 7 en el medio y a la derecha). La orientación de la fibra aumentó considerablemente en la cizalla uniaxial ya después de los 2 minutos. Además, la cizalla uniaxial pero no unidireccional orientó la fibra más corta que 50 micrones a la dirección de la cizalla, lo que nos permite formar estructuras de soporte de carga heterogéneas en la matriz. Sin embargo, las fibras de más de 50 micrones no pudieron mantener la orientación en la cizalla cuando se alteró la dirección de la cizalla. Durante la impresión por extrusión, el patrón de cizalla es uniaxial y unidireccional en la boquilla, de este modo se orientan a las fibras en la dirección del flujo. Tras el cese rápido del flujo, se puede mantener la orientación de la fibra uniaxial, lo que afectará la capacidad de carga de las estructuras. Estas estructuras están inspiradas en la naturaleza y, por ejemplo, las fibras de colágeno II en el cartílago articular están cambiando la orientación en diferentes capas de cartílago.

**Ejemplo 4a Reticulación de la biotinta**

Un ejemplo de biotinta es una mezcla de gellan y alginato mezclado con partículas de cartílago micronizado humano o partículas de HA (tamaño  $\leq 40 \mu\text{m}$ ). Tras la adición de cationes mono, di o trivalentes, la gelificación (transición sol-gel) es producida a medida que las hélices son añadidas en zonas de unión que están unidas en una red tridimensional por medio de la parte enrollada de la molécula. El proceso de impresión es dividido en tres etapas, a saber, preimpresión de biotinta, proceso de impresión y reticulación posimpresión. Inicialmente, la biotinta fue cargada en una jeringa y el polímero de soporte en una segunda jeringa. En esta etapa, una pequeña cantidad de cationes estaba presente en el biotinta para aumentar la viscosidad y mejorar las propiedades de impresión. Durante el proceso de impresión del coextrudido del soporte, los cationes son difundidos a la periferia de las estructuras impresas para iniciar la reticulación. Después de completar la estructura final, el soporte puede ser eluido en medio suplementado con catión a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

**Ejemplo 4b: Análisis reológico**

La mejora de la viscosidad relacionada con los cationes y las propiedades de reticulación pueden ser investigadas con pruebas reológicas y mecánicas. Las propiedades reológicas de las partículas de cartílago Biotinta, Biotinta+ HA y Biotinta + fueron medidas con un reómetro Anton Paar MCR 301 (Anton Paar, Zofingen, Switzerland) para determinar el comportamiento de cizalla y la recuperación de la cizalla. Todas las composiciones de biotinta mostraron un comportamiento pseudoplástico que es crítico para la extrusión (Fig. 11a). Además, todas las composiciones tenían un punto de fluencia (formación débil de gel) antes de la extrusión que es importante para prevenir la sedimentación de partículas y células en la jeringa (Tabla 1).

**Tabla 1.** Resumen de las mediciones reológicas. Los puntos de fluencia fueron calculados usando la ecuación de Herschel/Bulkley. \* Recuperación de cizalla a los 10 s después de la segunda secuencia de cizalla.

	Biotinta	Biotinta+HA	Biotinta+ partículas de Cartílago
Punto de fluencia	15,6 Pa $\pm$ 0,7 Pa	17,7 Pa $\pm$ 6,5 Pa	122 Pa $\pm$ 22 Pa
Cese en 10s*	21%	90%	98%
G' máximo	152 kPa $\pm$ 3,0 kPa	110 kPa $\pm$ 2,0 kPa	96 kPa $\pm$ 1,0 kPa

Las curvas de recuperación de cizalla (Fig. 11b) ilustran la recuperación de la estructura de biotinta después del proceso de impresión. La recuperación de cizalla después de la segunda secuencia de cizalla fue de 98% en Biotinta + Partículas de cartílago y 90% en Biotinta + HA después de diez segundos. Al mismo tiempo, la Biotinta sola recuperó sólo 21% del módulo original. La Fig. 11c ilustra el módulo de almacenamiento G' después de la reticulación inducida por cationes de Biotinta sola en la que la concentración de cationes y la fuente tuvieron una clara influencia. La Fig. 11d ilustra el módulo de almacenamiento final para las tres composiciones de biotinta. La biotinta sola tuvo el módulo de almacenamiento final más alto (152kPa  $\pm$  3kPa) en comparación con Biotinta + Partículas de cartílago (96kPa  $\pm$  1 kPa) y Biotinta + HA (110kPa  $\pm$  2kPa), lo que sugiere que la reticulación es algo obstaculizada por las partículas, independientemente de su fuente.

**Ejemplo 4c: Propiedades mecánicas y comportamiento de hinchamiento**

Las propiedades mecánicas de las estructuras cartilaginosas bioimpresas fueron evaluadas en tensión. Los especímenes con forma de pesas para tensión fueron impresas usando Biotinta + partículas de HA con o sin células. La trayectoria de la boquilla (dirección de impresión) en la sección de calibración de la muestra fue seleccionada para que sea paralela a la dirección de la tensión (Fig. 12a). El módulo de Young fue significativamente mayor en las construcciones acelulares (E = 230 kPa  $\pm$  7,0 kPa) en comparación con las celulares (E = 116 kPa  $\pm$  6,8 kPa) (p <0,001), lo que sugiere que las células aumentan el cumplimiento de la construcción y/o inhiben la reticulación. No hubo diferencia en la tensión de falla entre las construcciones acelular (37%  $\pm$ 6,4%) y celular (34%  $\pm$ 2,1%) (p = 0,54).

El hinchamiento de la biotinta con y sin partículas fue cuantificado para evaluar la retención de agua total y la retención de agua después de la reticulación en gel (Figura 12c-d). El hinchamiento a 37 °C hasta 48 horas aumentó el peso del hidrogel entre 2000-3800% del peso seco de la muestra, que es típico de hidrogeles y entre 26% y 54% del peso de reticulación de los hidrogeles. Fue logrado un estado completamente hidratado después de 24 horas y, más específicamente, biotinta y biotinta + partículas de cartílago fueron hidratadas completamente después de 5 horas, lo que sugiere una cinética de hinchamiento más rápida. La comparación entre las relaciones de hinchamiento de la biotinta sola y las composiciones que contienen partículas después de 48 horas sugirió dependencia del tipo de partícula.

#### **Ejemplo 4d: Compatibilidad de la biotinta**

El proceso de bioimpresión celular fue investigado con biotinta + HA para excluir todas las interacciones y señales de proliferación entre partículas y células. Fueron impresos discos gruesos de una capa para evaluar la viabilidad celular después de la impresión (Fig. 13a), que fue comparada con la viabilidad inicial de las células antes de la mezcla. Para investigar la viabilidad celular en estructuras grandes, fue impresa una nariz del tamaño de un adulto joven (3,1 cm, 2,6 cm y 1,5 cm) y fue mantenida en cultivo estático hasta que fue evaluada la viabilidad celular en la mitad de la construcción desde un corte central (distancia mínima de difusión de 5 mm). La bioimpresión con las partículas mostró una viabilidad de 80% tres horas después de la impresión, sin embargo, después de cuatro días la viabilidad celular fue recuperada a 97% en la que permaneció hasta el final del experimento. El injerto de nariz del tamaño de un adulto joven tenía una viabilidad disminuida en el centro de la matriz de soporte (60% de células viables en el día 7) en comparación con 96% de viabilidad en la periferia (Figura 13b). Esto sugiere la necesidad de incorporar porosidad o canales internos para mejorar el transporte de la nutrición. Mediante la introducción de la porosidad interconectada en cubos de 1,5 cm de altura, la viabilidad en el centro de la estructura era tan alta como en la periferia. Tales canales de nutrición o porosidad manipulada pueden ser incorporados en las estructuras bioimpresas mediante la extrusión del polímero de soporte dentro de los injertos, que posteriormente se puede eliminar en las subsiguientes etapas de lavado/reticulación. Con esta técnica se puede crear una compleja red porosa interconectada en 3D que se usa para perfundir los injertos con medio rico en nutrientes. Para mejorar adicionalmente el transporte masivo de nutrientes, los injertos también pueden ser preacondicionados en biorreactores dinámicos.

El efecto de las partículas de cartílago y el factor de crecimiento, en este caso TGF- $\beta$ 3, fue evaluada la suplementación sobre la proliferación celular en geles fundidos cultivados durante 21 días. La biotinta sola no estimuló la proliferación celular; de hecho, hubo una pérdida de ADN en el día 7 que fue recuperada lentamente. Biotinta + partículas de cartílago, por otro lado, estimularon la proliferación y causaron un aumento estadísticamente significativo ( $p < 0.001$ ) en el ADN durante 21 días. Con la suplementación con TGF- $\beta$ 3, hubo un aumento estadísticamente significativo en el ADN en las muestras que contienen partículas de cartílago en el día 7 ( $p < 0,001$ ). En el día 21, ambas biotintas mostraron aumentos en el ADN, que no fueron estadísticamente significativos entre sí.

#### **Ejemplo 4e: Producción de matriz extracelular y formación de cartílago.**

La producción de matriz extracelular de cartílago fue evaluada en biotinta sola y biotinta + partículas de cartílago con histología e inmunotinción después de 3 y 8 semanas en cultivo. La evaluación histológica después de 3 semanas reveló un claro aumento en el número de células, la síntesis de GAG y la producción de colágeno II en ambas composiciones de biotinta suplementadas con TGF- $\beta$ 3 (10ng/ml). Además, biotinta + partículas de cartílago sin factores de crecimiento estimularon la proliferación celular por encima de biotinta sola, lo que fue claramente visible con tinción H&E de 3 y 8 semanas. En ambos puntos de tiempo, biotinta + partículas de cartílago mostraron un ligero aumento en la tinción de azul Alcian y en el punto de tiempo de 8 semanas fue observada una ligera tinción de colágeno II, lo que sugiere la necesidad de una estimulación adicional del factor de crecimiento. A menudo se observó que las células proliferaban alrededor de las partículas sin la suplementación del factor de crecimiento, lo que sugiere que la adhesión de las partículas-células y/o los factores de crecimiento en las partículas son importantes. Sin embargo, debido a que no se observó proliferación específica del sitio en las muestras de biotinta + partículas de cartílago con TGF- $\beta$ 3, los resultados sugieren más bien que las partículas son una fuente de factores de crecimiento mitogénicos y no señales adhesivas específicas de la matriz celular. Después de 8 semanas, el aspecto macroscópico de los armazones sugirió que la estimulación del factor de crecimiento tuvo un efecto claro en la producción de matriz de cartílago, ya que se observó un aspecto opaco y un aumento de tamaño. A las 8 semanas, ambas composiciones de biotinta suplementadas mostraron un aumento significativo en los componentes de ECM de cartílago y presentaron áreas que comenzaron a parecerse a la densidad celular y al contenido de GAG del cartílago nativo. Además, la deposición de colágeno II fue fuerte en todo el injerto en las condiciones suplementadas con factor de crecimiento, mientras que solo se observó tinción pericelular en las muestras cultivadas sin TGF- $\beta$ 3. Se halló colágeno I en biotinta + partículas de cartílago y en ambas condiciones suplementadas con TGF- $\beta$ 3, lo que sugiere cierta producción de fibrocartílago, quizás debido al paso de las células. En todas las condiciones, la calcificación estuvo ausente, lo que sugiere que el fenotipo del cartílago de los condrocitos era estable.

#### **Ejemplo 4f: Imágenes de resonancia magnética**

Para evaluar la retención de la forma de las estructuras impresas, fueron evaluadas diversas técnicas de MRI. La nariz impresa fue mantenida en PBS durante 2 semanas para asegurar un hinchamiento completo antes del examen de imágenes de RM ponderado en T2. Estas imágenes fueron segmentadas y convertidas en un archivo .STL y fueron

comparadas con el modelo original usado para imprimir y con el injerto cartilaginoso inmediatamente después de la impresión. La comparación del modelo original y el injerto impreso ilustra la extrusión precisa del material y las estructuras detalladas. Sin embargo, fueron observadas paredes de la fosa nasal ligeramente más gruesas en comparación con el modelo original. Además, cuando se compara la estructura impresa con el modelo de MRI después de 2 semanas de hinchamiento, fue observado un ligero engrosamiento de las paredes de las fosas nasales, sin embargo, no fueron detectados signos de degradación o deterioro de la forma.

#### **Ejemplo 5: Parámetros del proceso de bioimpresión**

Un factor importante del proceso de impresión reproducible es la conectividad de las líneas consecutivas. Para evaluar el efecto del espaciado entre líneas, se debe realizar una optimización del grosor de la línea. Se probaron parámetros de impresión tales como presión, tasa de alimentación y diámetro de aguja para estandarizar el grosor de la línea a  $900 \mu\text{m} \pm 53 \mu\text{m}$ . Después de la determinación del grosor promedio de la línea, se investigó la adhesión de línea a línea eficaz mediante la impresión de una serie de pesas de prueba de tensión que tienen un espaciado de línea diferente. Las pesas se probaron por tensión hasta la falla y los datos ilustran que al aumentar el espacio entre líneas aumenta la posibilidad de defectos en la estructura, lo que sugiere que para proporcionar propiedades mecánicas reproducibles para las estructuras impresas, las líneas se deben superponer aproximadamente 40-50%. Los datos sugirieron que la varianza de la tensión final a la falla no difirió en las muestras analizadas con una cantidad de líneas superpuestas de hasta 20%, mientras que el número de muestras que no eran lo suficientemente estables para la prueba aumentó al aumentar el espacio entre líneas. De acuerdo con los datos, el espaciado de línea óptimo está afectado por la biotinta en cuestión; sin embargo, al aumentar la superposición, disminuye la probabilidad de defectos relacionados con el proceso de impresión interno. Además, el espesor de la línea puede ser seleccionado libremente mediante el cambio de los parámetros del proceso, tales como presión, velocidad de impresión y diámetro de la aguja.

Fueron realizadas diversas mediciones de pruebas mecánicas para la biotinta recientemente diseñada para investigar los parámetros que afectan la reproducibilidad de las propiedades estructurales y mecánicas. La evaluación de la tensión de los especímenes impresos con diversas direcciones de impresión y con biotinta cargada de células reveló que el módulo de Young, estrés final y tensión a la falla no se alteran al añadir las células en la densidad de siembra de  $4 \times 10^6$ , lo que ilustra que la fracción de volumen de las células ( $\sim 1\%$  aproximadamente) se compensa con la fuerte matriz circundante. Además, las muestras en forma de pesa fueron impresas en diferentes direcciones de impresión con respecto a la tensión, es decir, paralelas a la tensión ( $0^\circ$ ), perpendiculares a la tensión ( $90^\circ$ ) y en un ángulo de  $45^\circ$  con respecto a la tensión ( $45^\circ$ ). La dirección de impresión no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, lo que sugiere que las estructuras bioimpresas pueden ser diseñadas en función de los parámetros relacionados con la impresión y el proceso, en lugar de basarse en la carga mecánica estimada de las estructuras finales.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de proporción de una matriz de soporte de injerto para reparación de cartílagos, particularmente en un paciente humano, que comprende las etapas de:
  - proporcionar una solución acuosa de un polisacárido de gelificación;
  - 5       - proporcionar al menos uno de:
    - partículas y/o fibras y
    - células de mamífero;
  - mezclar dicha solución acuosa de un polisacárido de gelificación, dichas partículas y/o fibras, y/o dichas células de mamífero para obtener una mezcla de impresión;
  - 10       - depositar dicha mezcla de impresión en una forma tridimensional,

en el que dicho polisacárido de gelificación es goma gellan, goma gellan acilada y/o sulfatada, y

en el que dicha mezcla de impresión comprende 3% o 3,5% (p/v) de dicho polisacárido de gelificación, y en el que dicha solución de un polisacárido de gelificación también comprende alginato.
- 15   2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha solución acuosa de un polisacárido de gelificación además comprende entre 10 y 150 mmol/l de cationes divalentes.
3. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las células de mamífero y al menos una de las partículas y fibras son proporcionadas para obtener dicha mezcla de impresión.
4. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha solución de un polisacárido de gelificación comprende un azúcar monosacárido o azúcar disacárido, en osmolaridad fisiológica.
- 20   5. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que un factor de crecimiento y/o un factor mitogénico son proporcionados dentro de la mezcla de impresión.
6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el factor de crecimiento y/o factor mitogénico es seleccionado de BMP-2, BMP- 7, TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, FGF-2, y/o IGF-1.
- 25   7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en el que la concentración de los factores de crecimiento es 0,1-5 ng/ml, 5-50 ng/ml o 50-500 ng/ml.
8. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dichas células de mamífero son células de cartílago, células madre de cartílago o células precursoras de cartílago.
9. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dichas células de mamífero están presentes en concentraciones de  $3 \times 10^6$  células/ml -  $50 \times 10^6$  células/ml.
- 30   10. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha mezcla de impresión comprende 10 ng/ml de TGF beta 3.
11. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la deposición de dicha mezcla de impresión en una forma tridimensional es realizada mediante la deposición de líneas de dicha mezcla de impresión, en el que cada línea tiene un ancho de 700 a 1100 μm, y dichas líneas se superponen en 20% a 60%.
- 35   12. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha forma tridimensional es derivada mediante procedimientos de impresión 3-D.
13. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha forma tridimensional es derivada mediante procedimientos de fabricación aditiva.
- 40   14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, en el cual el procedimiento de fabricación aditiva es un procedimiento de impresión por chorro de tinta, bioimpresión, impresión por extrusión o capa por capa.
15. Una matriz de soporte de injerto obtenible por, u obtenida por, el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.

Fig. 1

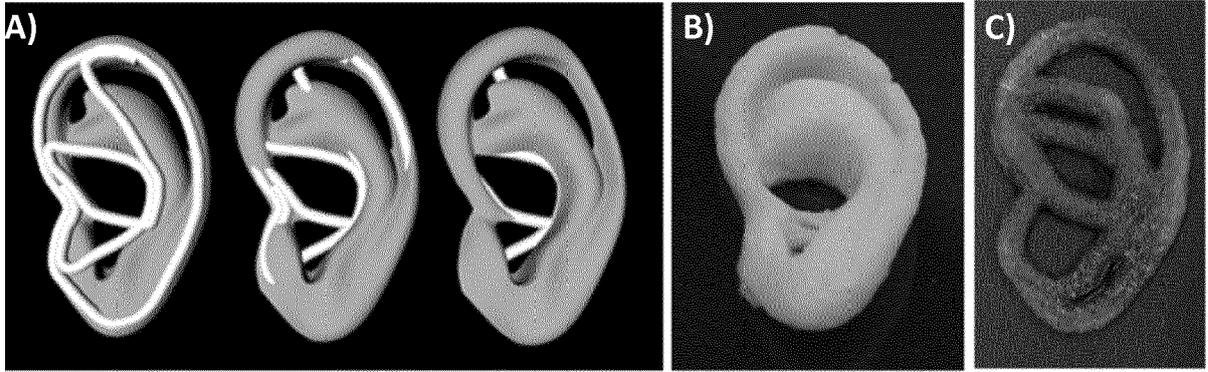


Fig. 2

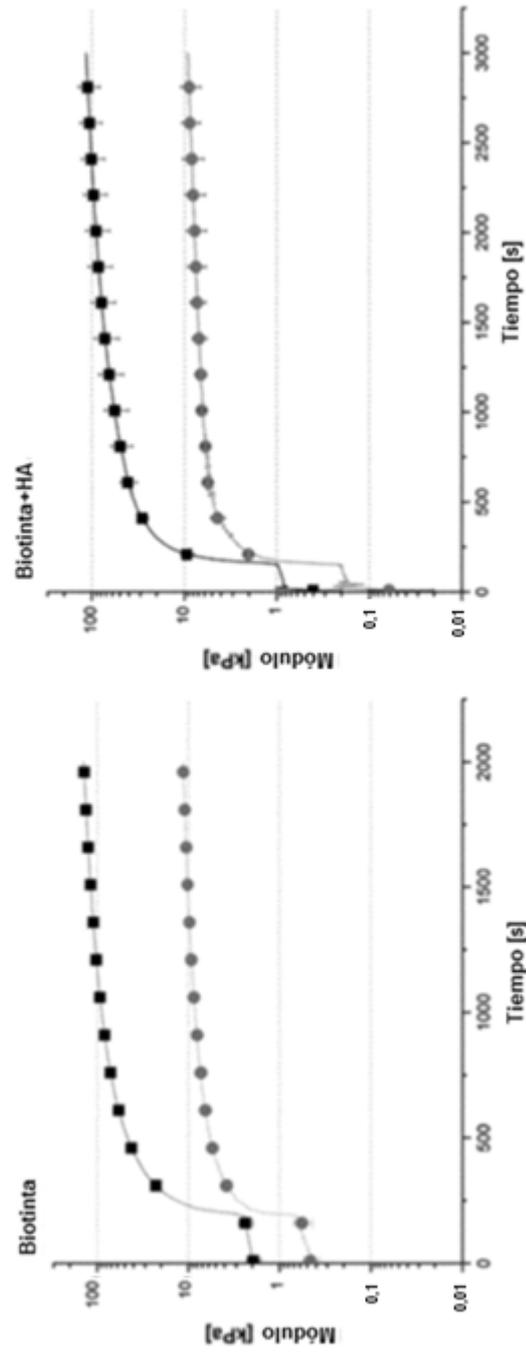


Fig. 3

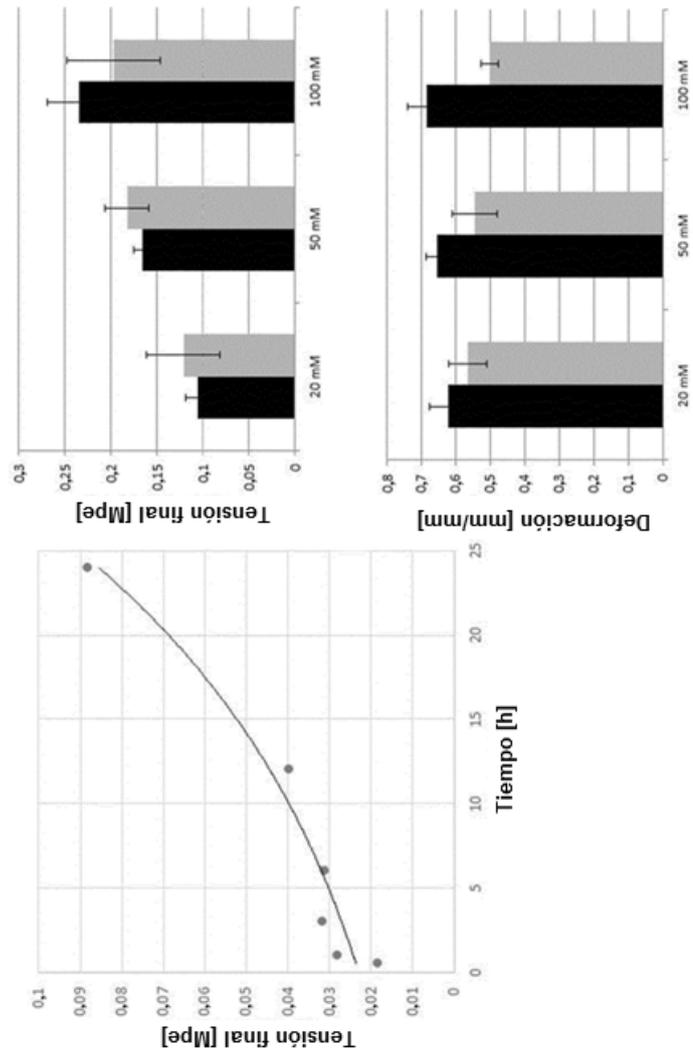


Fig. 4

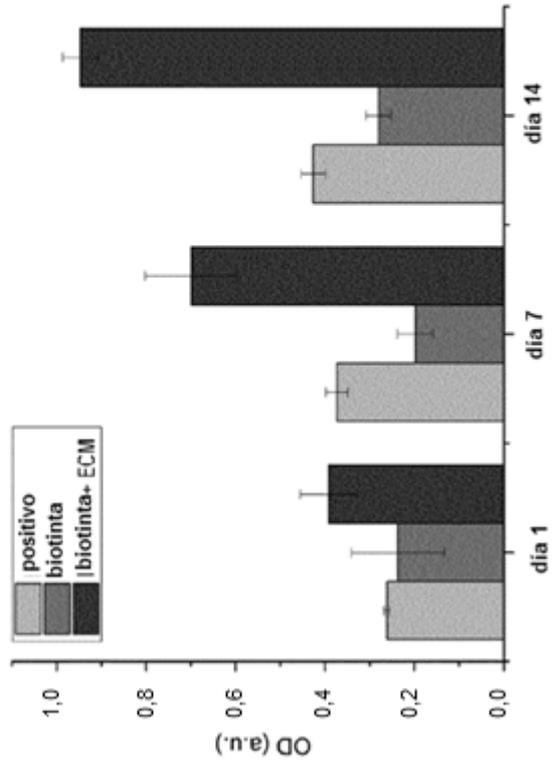


Fig. 5

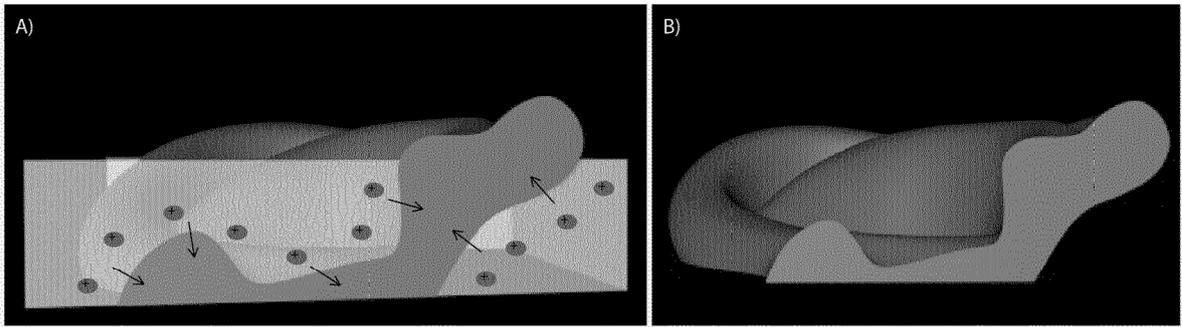


Fig. 6

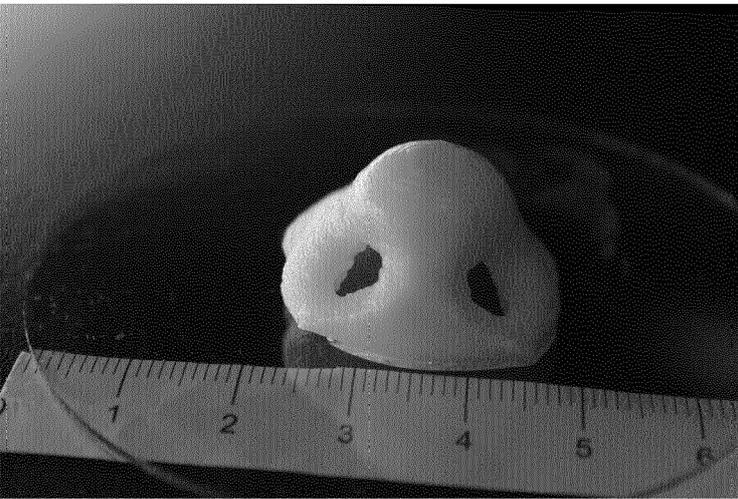


Fig. 7

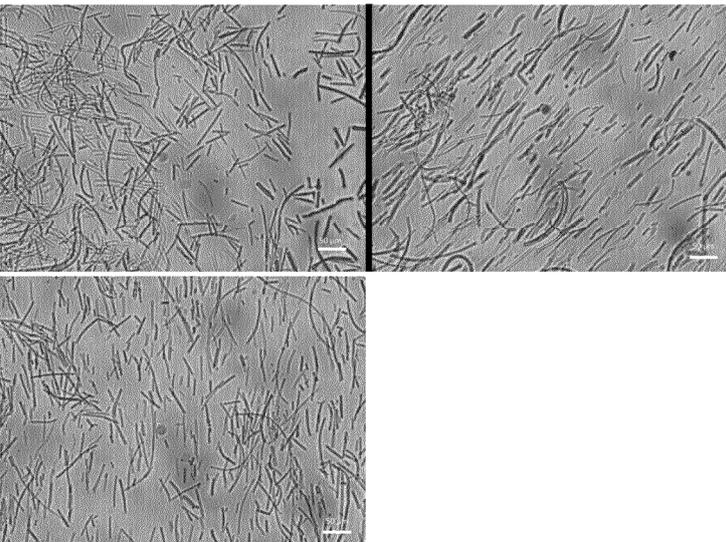


Fig. 8

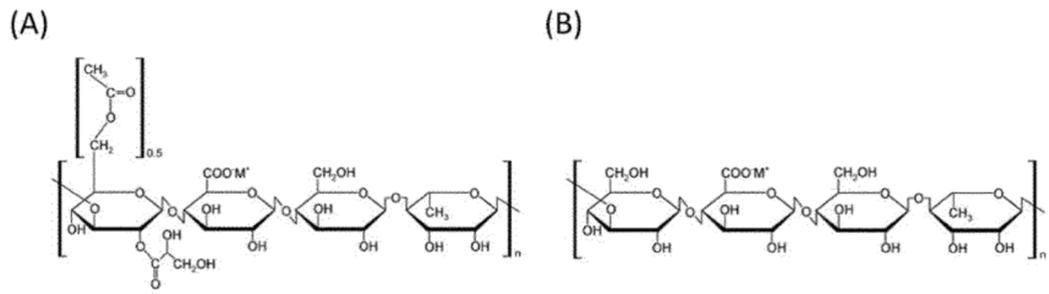


Fig. 9

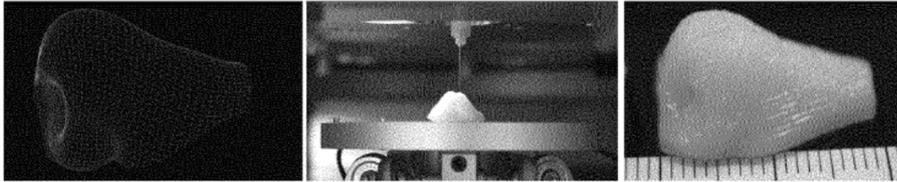


Fig. 10

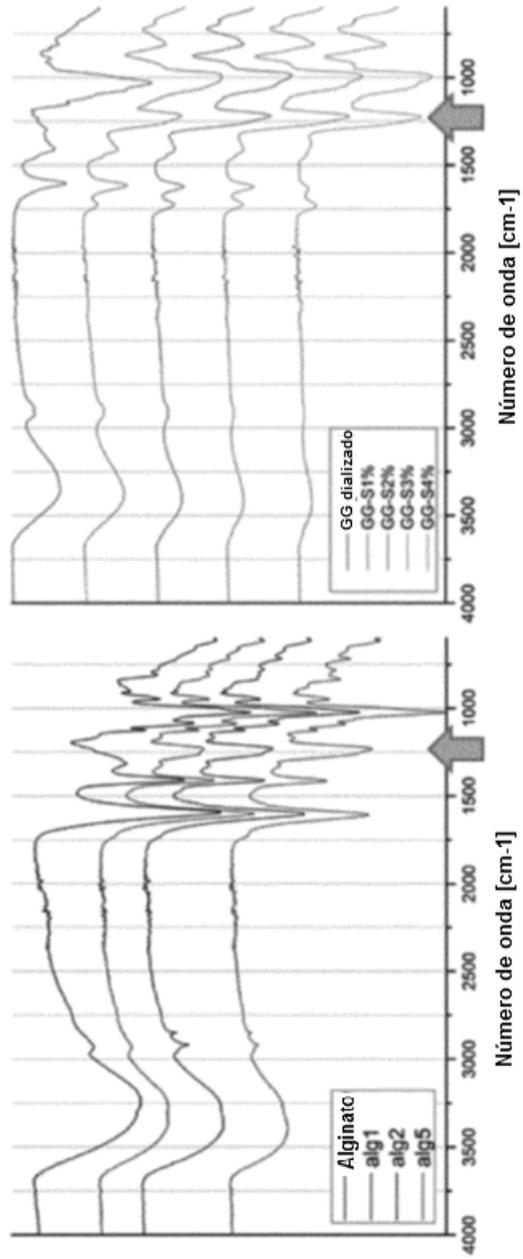


Fig. 11

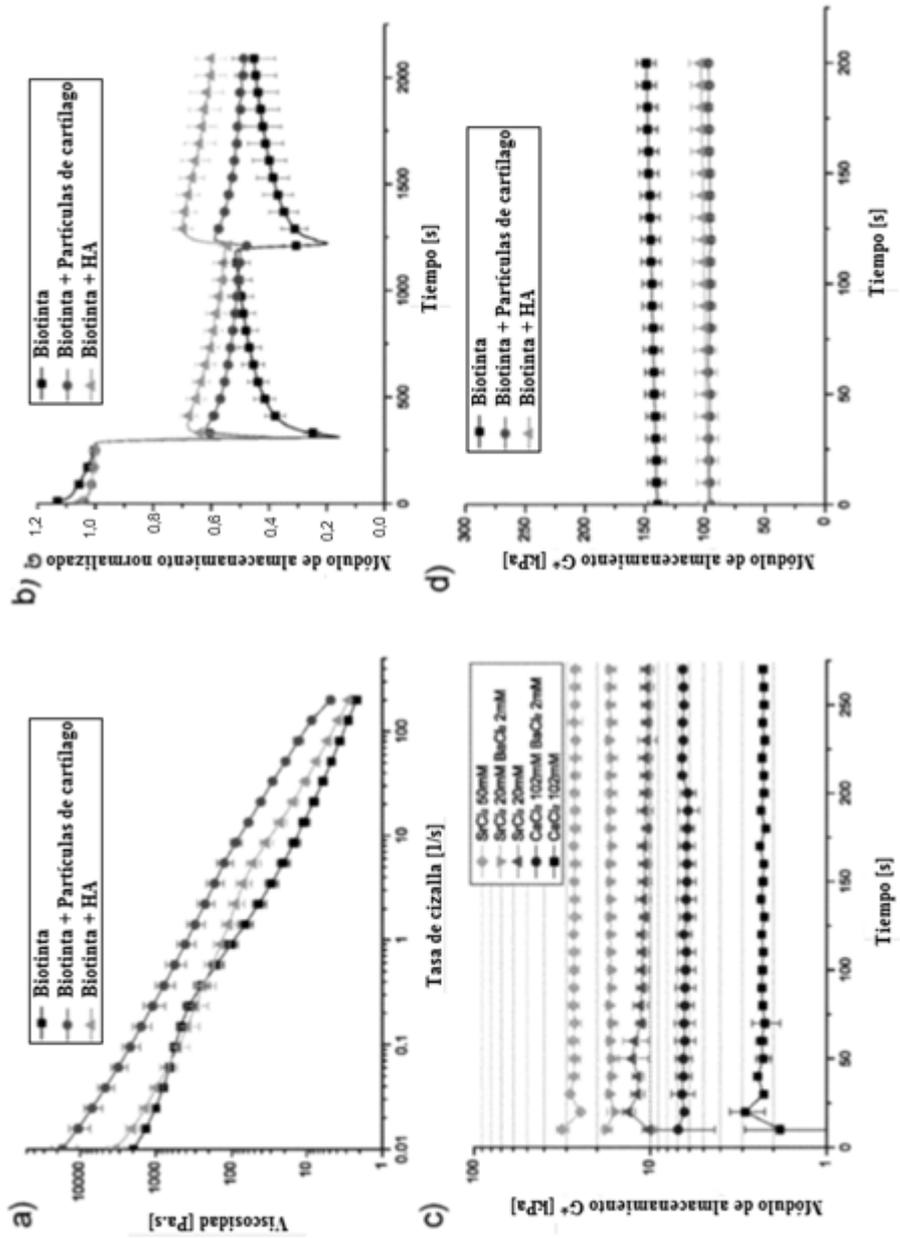


Fig. 12

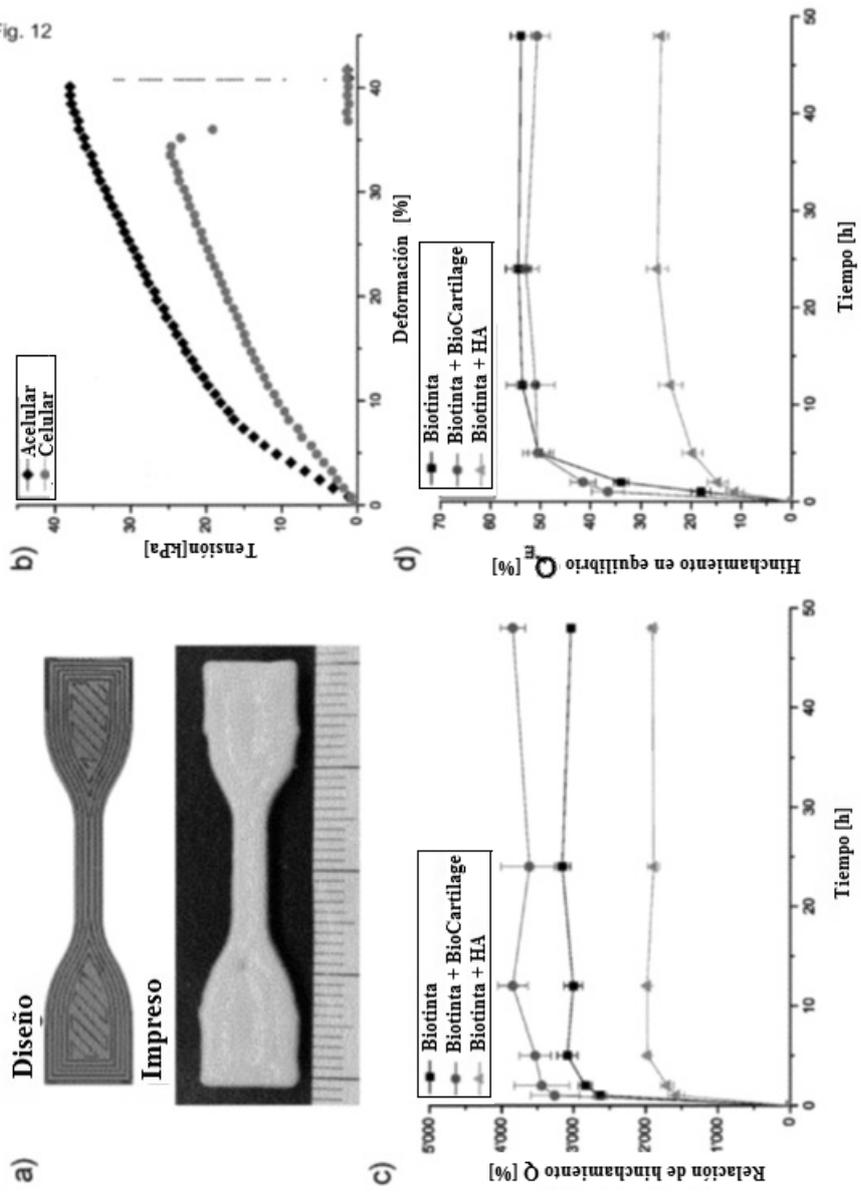


Fig. 13

