

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 829 412**

51 Int. Cl.:

A61L 31/08

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.05.2014** **PCT/US2014/038597**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.11.2014** **WO14189835**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.05.2014** **E 14800261 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.09.2020** **EP 2999494**

54 Título: **Injertos antitrombogénicos**

30 Prioridad:

20.05.2013 US 201361825256 P

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

31.05.2021

73 Titular/es:

**YALE UNIVERSITY (100.0%)
Two Whitney Avenue
New Haven, CT 06511, US**

72 Inventor/es:

**DIMITRIEVSKA, SASHKA y
NIKLASON, LAURA**

74 Agente/Representante:

MILTENYI , Peter

ES 2 829 412 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

Injertos antitrombogénicos

Antecedentes de la invención

- El injerto vascular es el uso de vasos sanguíneos trasplantados o armazones sintéticos para reemplazar, reparar o sortear vasos dañados o potencialmente peligrosos. Los injertos vasculares se implantan en sujetos con una amplia variedad de enfermedades y trastornos, incluyendo enfermedad cardiovascular, aterosclerosis, enfermedad vascular periférica, aneurisma aórtico abdominal y similares. Estos injertos pueden mejorar o restaurar el flujo sanguíneo a las regiones en las que el flujo está obstruido. Si bien hoy en día se usan tradicionalmente vasos autólogos o vasos sintéticos elaborados de materiales biocompatibles, ha habido cierto desarrollo en el uso de estructuras descelularizadas como injertos vasculares. Los injertos vasculares descelularizados conservan la forma y estructura de los vasos nativos, pero carecen de células, lo que minimiza la inmunogenicidad de los injertos. Están desarrollándose diversas estructuras biológicas descelularizadas como injertos vasculares de pequeño calibre. Actualmente, su principal inconveniente es la alta trombogenicidad, que puede reducirse recelularizando el lado luminal del implante con células huésped. Sin embargo, esta solución implica al menos un mes de tiempo de espera específico para el paciente, debido a la recogida y expansión requeridas de células endoteliales autólogas para revestir la luz del injerto. Para el uso clínico de los injertos vasculares biológicos de reciente aparición (tales como injertos descelularizados nativos y con tejido modificado por ingeniería), es necesaria una solución que estará disponible en el momento de la necesidad para la aplicación clínica. El documento US 2001/044654 da a conocer composiciones recubiertas de injerto vascular descelularizado que comprenden heparina.
- Por tanto, existe una necesidad en la técnica de recubrimientos antitrombogénicos de injertos vasculares. La presente invención satisface esta necesidad insatisfecha.

Sumario de la invención

- Tal como se describe a continuación, la presente invención incluye composiciones antitrombogénicas, tales como injertos vasculares antitrombogénicos, composiciones que comprenden tejido descelularizado recubierto con un recubrimiento antitrombogénico y métodos de preparación de composiciones antitrombogénicas.

Breve descripción de los dibujos

- La siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención se comprenderá mejor cuando se lea junto con los dibujos adjuntos. Con el fin de ilustrar la invención, se muestran en los dibujos realizaciones que son actualmente preferidas. Debe entenderse, sin embargo, que la invención no se limita a las disposiciones e instrumentos precisos de las realizaciones mostradas en los dibujos.

La figura 1 es una descripción esquemática del recubrimiento basado en HA-heparina de estructuras de injertos descelularizados, usando HA tiolado como una primera capa de recubrimiento y heparina aminada "en el extremo" como una segunda capa del recubrimiento.

- La figura 2A representa la descripción esquemática de la modificación de heparina para la modificación de heparina "en el extremo" y la adición de sulfo-SMCC para la reticulación espontánea de heparina en vasos descelularizados recubiertos con ácido hialurónico.

La figura 2B representa la caracterización por RMN de la modificación de heparina.

- La figura 3 es un conjunto de imágenes que representan las secciones transversales de aortas abdominales porcinas descelularizadas recubiertas con HA usando concentraciones crecientes de agente reticulante de SM(PEG)₁₂ (agente reticulante NHS-maleimida). A medida que aumenta la concentración del agente reticulante, también aumenta la suavidad y el grosor del recubrimiento, tal como lo demuestra la capa cada vez más gruesa de tinte azul sobre la superficie (azul de toluidina) y la capa de tinte naranja (azul Alamar pH 1). El recubrimiento está indicado por flechas tanto en azul de toluidina como en azul Alamar pH 1 (AB pH 1).

- La figura 4 es un conjunto de imágenes que representan las imágenes SEM panorámicas de aortas abdominales de rata descelularizadas de control (aortas que están descelularizadas sin tratamiento adicional), aortas descelularizadas recubiertas con ácido hialurónico y aortas recubiertas con ácido hialurónico-heparina capa por capa.

- La figura 5 es una imagen que representa una sección transversal SEM de aortas abdominales de rata descelularizadas tubulares enteras recubiertas con HA-heparina capa por capa. El recubrimiento puede verse claramente en el lado luminal de los vasos como una capa de unos pocos micrómetros de grosor tal como se indica mediante una flecha blanca.

La figura 6 es un conjunto de imágenes que representan secciones histológicas de aortas abdominales de ratas de control tubulares completas (aortas descelularizadas sin tratamiento adicional), y aortas descelularizadas recubiertas con heparina y ácido hialurónico capa por capa. Las secciones se tiñeron con azul de toluidina, azul alcian pH1 y

azul alción PAS. El recubrimiento puede verse claramente en el lado luminal de los vasos como una capa de unos pocos micrómetros de grosor.

La figura 7 es un conjunto de imágenes SEM de plaquetas aisladas de sangre de rata incubadas en aortas abdominales de rata de control descelularizadas, aortas descelularizadas recubiertas con ácido hialurónico y con ácido hialurónico-heparina capa por capa. Las plaquetas y la formación de trombos son claramente visibles en el control. Los vasos tratados muestran una ausencia completa de adhesión de plaquetas.

La figura 8 es un conjunto de imágenes que representan los resultados de experimentos en los que las plaquetas se tiñeron con faloidina (que produce un color rojo en las plaquetas), se incubaron en aortas abdominales de rata de control descelularizadas y aortas descelularizadas recubiertas con ácido hialurónico-heparina capa por capa. Las plaquetas son claramente visibles en la aorta de control. Las aortas recubiertas muestran ausencia de plaquetas.

La figura 9 es un gráfico que representa la determinación de la heparina de superficie funcional mediante el ensayo del factor X donde los efectos de la heparina sobre la inactivación del factor X se expresan en pesos equivalentes de heparina calculados nuevamente. Las muestras sometidas a ensayo fueron: aortas de control descelularizadas, aorta de rata nativa recién extirpada con una capa continua de células endoteliales conservadas, una monocapa continua cultivada de HUVEC y aortas de rata descelularizadas recubiertas con ácido hialurónico-heparina.

La figura 10 es una imagen que representa los resultados de experimentos en los que las HUVEC se sembraron en placas sobre aortas recubiertas capa por capa con HA-heparina y se cultivaron durante 2 semanas. El citoesqueleto de HUVEC se tiñó con faloidina (rojo) y el núcleo de HUVEC se tiñó con DAPI (azul) y se obtuvieron imágenes sobre un apilamiento z de 10 μm . Los ejes x e y se muestran a los lados de la imagen donde se ven las HUVEC creciendo una monocapa no plana. Puede verse las HUVEC invadiendo el recubrimiento.

La figura 11 es un panel de gráficos que muestra el módulo de almacenamiento (G' círculos completos) y módulo de pérdida (G'' círculos abiertos) de geles de HA y agente reticulante de HA-PEG incubados en aorta porcina descelularizada representada en función del tiempo. Los paneles A y B muestran el ácido hialurónico cargado en la aorta porcina descelularizada en ausencia del agente reticulante de PEG y donde los módulos elásticos (G') y de pérdida (G'') se representan frente al tiempo en Log (panel A) o Ln (panel B). Los paneles C y D muestran el ácido hialurónico cargado en la aorta porcina descelularizada con la adición de agente reticulante de PEG. Los módulos elásticos (G') y de pérdida (G'') se representan gráficamente frente al tiempo en Log (panel C) o Ln (panel D). Se calculó que el módulo de almacenamiento G era de 37 kPa para HA-PEG y 2 kPa para los geles de HA sin el agente reticulante de PEG en la forma polimerizada al 80% de los geles usando la ecuación compleja del módulo de almacenamiento anterior. De importancia para los desarrollos del recubrimiento, los geles de HA-PEG alcanzan su forma reticulada madura en el plazo de 4 horas de incubación y los geles de HA solos alcanzan una forma madura en el plazo de 23 horas de incubación. Esto indicó que después de al menos 4 horas de perfusión luminal de los geles de HA dentro de los vasos, deberían tener recubrimientos completamente polimerizados.

La figura 12 es un panel de imágenes que muestra la evaluación de la estabilidad de las aortas de rata descelularizadas sin recubrimiento de control (panel de imágenes de la izquierda) y las aortas de rata descelularizadas recubiertas con ácido hialurónico/heparina (panel de imágenes de la derecha) a 37°C durante dos semanas incubadas con PBS (panel A) y plasma de rata recién extraído (panel B). Tras la incubación tanto con PBS como con plasma de rata, el recubrimiento permanece presente y visible mediante tinciones con AB/PAS y azul de toluidina.

La figura 13 es un panel de imágenes que muestra HUVEC sembradas sobre las tres capas de recubrimiento diferentes depositadas teñidas con DAPI (azul) y VE-cadherina (rojo) después de tres días de cultivo. Los componentes del recubrimiento son biocompatibles y apoyan el crecimiento y la proliferación de células endoteliales *in vitro* en periodos de tiempo cortos.

La figura 14 es un panel de imágenes que muestra secciones transversales de injertos descelularizados de rata implantados de extremo a extremo en aortas abdominales de rata después de 4 semanas del implante. El panel superior muestra un ejemplo del grupo de control en el que el injerto implantado era una aorta de rata descelularizada sin modificaciones adicionales. El panel inferior mostrado un ejemplo de injerto descelularizado de rata recubierto con ácido hialurónico implantado de extremo a extremo en la aorta abdominal de rata 4 semanas después del implante. Todas las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) mostrando la migración de células abluminales dentro de los injertos y la deposición celular dentro del gran coágulo de sangre de la rata del grupo de control.

La figura 15 es un panel de imágenes que muestra explantes y evaluación de ecografía Doppler de la permeabilidad del injerto en la semana 4. El panel superior es la aorta de rata descelularizada de control y el panel inferior es la aorta de rata descelularizada recubierta con ácido hialurónico. Los implantes de control no mostraron registro de flujo según la ecografía Doppler donde una línea plana indica la ausencia de flujo. La imagen del explante mostrado un gran coágulo de sangre fibrótico bien formado en el centro del implante que evitaba cualquier flujo sanguíneo a través del injerto. El injerto también se dilata hasta 20 veces su tamaño original, lo que indica que la pared del injerto fueron probablemente semana y una gran formación de anastomosis. Por otro lado, el registro Doppler de aortas

descelularizadas de rata recubiertas con ácido hialurónico (panel inferior) muestra el flujo pulsátil típico de rata indicativo de flujo vascular sano y lecturas de flujo de aorta de rata típicas de pico de velocidad de 30 cm/s. La imagen del explante muestra la ausencia de oclusiones lumenales, coágulos y bloqueos y se siembra que el injerto está dentro de las dimensiones implantadas de 2 mm de diámetro indicando la ausencia de dilatación.

- 5 La figura 16 es un panel de imágenes que muestra secciones transversales de TEVG descclularizados implantados de extremo a lado en arterias carótidas de perro después de 4 semanas del implante. El panel superior muestra un ejemplo del grupo de control donde el injerto implantado era un TEVG descclularizados sin modificaciones adicionales. El panel inferior muestra un ejemplo de TEVG descclularizados recubiertos con ácido hialurónico. Todas las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E). La ausencia de coágulos sanguíneos y oclusiones se observa en los injertos recubiertos y el depósito de células endoteliales también es visible en los injertos recubiertos con ácido hialurónico-heparina.

Descripción detallada

- 15 La presente invención se refiere a composiciones recubiertas antitrombogénicas y a métodos para preparar tales composiciones. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la presente invención proporciona injertos vasculares recubiertos con un recubrimiento antitrombogénico. La presente invención se basa en el descubrimiento de que recubrir la superficie luminal de un vaso sanguíneo descclularizado con una capa de ácido hialurónico modificado con tiol (HA modificado con tiol) o un recubrimiento multicapa de HA modificado con tiol y heparina u otras moléculas previene la trombogénesis en el vaso. Por tanto, en una realización, la invención proporciona una composición de injerto vascular antitrombogénico que comprende un vaso sanguíneo descclularizado en la que la superficie luminal del vaso sanguíneo se recubre con una capa de HA modificado con tiol. En otra realización, la invención proporciona una composición de injerto vascular antitrombogénico que comprende un vaso sanguíneo descclularizado en la que la superficie luminal del vaso sanguíneo se recubre con un recubrimiento multicapa en el que al menos una capa comprende HA modificado con tiol y al menos otra capa comprende heparina. En una realización, la capa de HA modificado con tiol se reticula con la superficie luminal del vaso. En una realización, la capa de heparina se reticula con la capa de HA modificado con tiol. En determinadas realizaciones, una o más capas del recubrimiento comprenden un hidrogel. En otras realizaciones, la capa de HA modificado con tiol se une a otras superficies en contacto con la sangre, tales como plásticos contenidos en injertos vasculares o catéteres, o vasculatura nativa que conduce la sangre.

- 30 El injerto vascular recubierto puede usarse, por ejemplo, para tratar a un sujeto que tiene un vaso sanguíneo enfermo o bloqueado. En determinadas realizaciones, el injerto vascular recubierto se usa para tratar un aneurisma. En otra realización, el injerto vascular recubierto se usa para sortear un vaso enfermo o bloqueado. En otra realización, el injerto vascular recubierto se usa para proporcionar acceso vascular en un sujeto que se somete o se prevé que se someta a hemodiálisis.

Definiciones

- 35 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento puede usarse en la práctica o pruebas de la presente invención, se describen los métodos y materiales preferidos.

- 40 Tal como se usa en el presente documento, cada uno de los siguientes términos tiene el significado asociado a ellos en esta sección.

Los artículos “un” y “una” se usan en el presente documento para hacer referencia a uno o más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, “un elemento” significa un elemento o más de un elemento.

- 45 Tal como se usa en el presente documento, el término “anómalo”, cuando se usa en el contexto de organismos, tejidos, células o componentes de los mismos, se refiere a aquellos organismos, tejidos, células o componentes de los mismos que difieren en al menos una característica observable o detectable (por ejemplo, edad, tratamiento o momento del día) de aquellos organismos, tejidos, células o componentes de los mismos que muestran la característica respectiva “normal” (esperada). Las características que son normales o esperadas para una célula o tipo de tejido pueden ser anómalas para una célula o tipo de tejido diferente.

- 50 “Aproximadamente” tal como se usa en el presente documento cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal y similares, pretende abarcar variaciones de $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$, más preferiblemente $\pm 5\%$, incluso más preferiblemente $\pm 1\%$, y todavía más preferiblemente $\pm 0,1\%$ del valor especificado, ya que tales variaciones son apropiadas para realizar los métodos dados a conocer.

- 55 Tal como se usa en el presente documento, “aliviar” una enfermedad, defecto, trastorno o estado significa reducir la gravedad de uno o más síntomas de la enfermedad, defecto, trastorno o estado.

Tal como se usa en el presente documento, “anticoagulante” se refiere a un agente o clase de agentes que previene

la coagulación o la coagulación de la sangre.

Tal como se usa en el presente documento, "recubrimiento antitrombogénico" se refiere a un recubrimiento que reduce la formación de trombos o coágulos de sangre.

5 Tal como se usa en el presente documento, "autólogo" se refiere a un material biológico derivado del mismo individuo en el que se reintroducirá posteriormente el material.

Tal como se usa en el presente documento, "alogénico" se refiere a un material biológico derivado de un individuo genéticamente diferente de la misma especie que el individuo en el que se introducirá el material.

10 Tal como se usa en el presente documento, "biocompatible" se refiere a cualquier material que, cuando se implanta en un mamífero, no provoca una respuesta adversa en el mamífero. Un material biocompatible, cuando se introduce en un individuo, no es tóxico ni dañino para ese individuo, ni induce el rechazo inmunitario del material en el mamífero.

15 Tal como se usa en el presente documento, los términos "polímero biocompatible" y "biocompatibilidad" cuando se usan en relación con polímeros se reconocen en la técnica. Por ejemplo, los polímeros biocompatibles incluyen polímeros que generalmente no son tóxicos para el huésped ni se degradan (si el polímero se degrada) a una velocidad que produce subunidades monoméricas u oligoméricas u otros subproductos a concentraciones tóxicas en el huésped. En una realización, la biodegradación generalmente implica la degradación del polímero en un huésped, por ejemplo, en sus subunidades monoméricas, que se sabe que son eficazmente no tóxicas. Sin embargo, los productos oligoméricos intermedios resultantes de tal degradación pueden tener diferentes propiedades toxicológicas, o la biodegradación puede implicar oxidación u otras reacciones bioquímicas que generan moléculas distintas de las subunidades monoméricas del polímero. En consecuencia, en una realización, la toxicología de un polímero biodegradable destinado a uso *in vivo*, tal como implante o inyección en un paciente, puede determinarse después de uno o más análisis de toxicidad. No es necesario que ninguna composición objeto tenga una pureza del 100% para que se considere biocompatible; de hecho, solo es necesario que las composiciones objeto sean biocompatibles tal como se ha indicado anteriormente. Por tanto, una composición objeto puede comprender polímeros que comprenden el 99%, el 98%, el 97%, el 96%, el 95%, el 90%, el 85%, el 80%, el 75% o incluso menos de polímeros biocompatibles, por ejemplo, incluyendo polímeros y otros materiales y excipientes descritos en el presente documento, y ser todavía biocompatible.

20 El término "portador biológicamente compatible" o "medio biológicamente compatible" se refiere a reactivos, células, compuestos, materiales, composiciones y/o formulaciones de dosificación que son adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesivas toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otra complicación acorde con una relación beneficio/riesgo razonable.

30 Tal como se usa en el presente documento, "recubrimiento" se refiere a una cubierta que se aplica a la superficie de un objeto, normalmente un sustrato. El recubrimiento puede ser continuo o no continuo sobre la superficie del sustrato. El recubrimiento puede tener una o más capas.

35 Por "reticulación" se entiende la creación de un enlace que une una cadena de polímero a otra. La reticulación puede inducirse a través de un agente de reticulación, disolución o fuente o puede inducirse mediante autoensamblaje.

40 Por "agente de reticulación" o "fuente de reticulación" se entiende un agente que puede formar enlaces químicos o iónicos entre moléculas. Los ejemplos no limitativos de agentes o fuentes de reticulación incluyen cloruro de calcio; persulfato de amonio (APS) y tetrametiletilendiamina (TEMED), glutaraldehído, epóxidos, dextrano oxidado, hidrazida de p-azidobenzoílo, éster de N-[α -maleimidoacetoxi]succinimida, p-azidofenilgloxal monohidratado, disulfuro de bis-[β -(4-azidosalicilamido)etilo], suberato de bis[sulfosuccinimidilo], propionato de ditiobis[succinimidilo], suberato de disuccinimidilo, clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS), riboflavina, calor, irradiación con luz visible, irradiación ultravioleta, irradiación con luz azul y combinaciones de los mismos.

45 Por "disolución de reticulación" se entiende un agente de reticulación en una disolución o disolvente.

50 El término "descelularizado" o "descelularización" tal como se usa en el presente documento, se refiere a una bioestructura (por ejemplo, un órgano, parte de un órgano o un tejido), del cual se ha retirado el contenido celular dejando atrás una infraestructura celular intacta. Algunos órganos se componen de diversos tejidos especializados. Las estructuras tisulares especializadas de un órgano, o parénquima, proporcionan la función específica asociada con el órgano. La red fibrosa de soporte del órgano es el estroma. La mayoría de los órganos tienen una estructura estrómic que se compone de tejido conjuntivo no especializado que soporta el tejido especializado. El proceso de descclularización retira las células tisulares especializadas, dejando atrás la compleja red tridimensional de la matriz extracelular. La infraestructura del tejido conjuntivo se compone principalmente de colágeno. La estructura descclularizada proporciona un sustrato biocompatible sobre el que pueden infundirse diferentes poblaciones de células. Las bioestructuras descclularizadas pueden ser rígidas o semirrígidas, teniendo la capacidad de alterar sus formas.

El término “derivado de” se usa en el presente documento con el significado de originarse a partir de una fuente específica.

Tal como se usa en el presente documento, “composición de matriz extracelular” incluye fracciones tanto solubles como no solubles o cualquier porción de las mismas. La fracción no soluble incluye las proteínas ECM secretadas y los componentes biológicos que se depositan sobre el soporte o armazón. La fracción soluble incluye se refiere a medios de cultivo en los que se han cultivado células y en los que las células han secretado agente(s) activo(s) e incluye aquellas proteínas y componentes biológicos no depositados sobre el armazón. Ambas fracciones pueden recogerse y opcionalmente procesarse adicionalmente y usarse individualmente o en combinación en una variedad de aplicaciones tal como se describe en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, el término “gel” se refiere a una estructura polimérica tridimensional que en sí misma es insoluble en un líquido en particular pero que puede absorber y retener grandes cantidades del líquido para formar una estructura estable, a menudo suave y flexible, pero siempre en un grado u otro, estructura que retiene la forma. Cuando el líquido es principalmente agua, el gel se denomina hidrogel.

Tal como se usa en el presente documento, un “injerto” se refiere a una composición que se implanta en un individuo, normalmente para reemplazar, corregir o superar de otro modo un defecto celular, tisular u orgánico. Un injerto puede comprender un armazón. En determinadas realizaciones, un injerto comprende tejido descelularizado. En algunas realizaciones, el injerto puede comprender una célula, tejido u órgano. El injerto puede consistir en células o tejido que se originan del mismo individuo; este injerto se denomina en el presente documento mediante los siguientes términos intercambiables: “autoinjerto”, “trasplante autólogo”, “implante autólogo” e “injerto autólogo”. Un injerto que comprende células o tejido de un individuo genéticamente diferente de la misma especie se denomina en el presente documento mediante los siguientes términos intercambiables: “aloinjerto”, “trasplante alogénico”, “implante alogénico” e “injerto alogénico”. Un injerto de un individuo a su gemelo idéntico se denomina en el presente documento “isoinjerto”, “trasplante singénico”, “implante singénico” o “injerto singénico”. Un “xenoinjerto”, “trasplante xenogénico” o “implante xenogénico” se refiere a un injerto de un individuo a otro de una especie diferente.

Tal como se usa en el presente documento, el término “intacto” se refiere a un estado en el que un elemento puede realizar su función original en un grado sustancial.

“Fotorreticulación” se refiere a la formación de enlaces que une una cadena de polímero con otra tras la exposición a la luz de longitudes de onda apropiadas. Por ejemplo, dos polímeros conjugados con un grupo fotorreactivo pueden fotorreticularse covalentemente mediante la formación de enlaces covalentes entre los grupos fotorreactivos.

Tal como se usa en el presente documento, el término “polimerización” o “reticulación” se refiere a al menos una reacción que consume al menos un grupo funcional en una molécula monomérica (o monómero), molécula oligomérica (u oligómero) o molécula polimérica (o polímero), para crear al menos un enlace químico entre al menos dos moléculas distintas (por ejemplo, enlace intermolecular), al menos un enlace químico dentro de la misma molécula (por ejemplo, enlace intramolecular), o cualquier combinación de los mismos. Una reacción de polimerización o reticulación puede consumir entre aproximadamente el 0% y aproximadamente el 100% del al menos un grupo funcional disponible en el sistema. En una realización, la polimerización o reticulación de al menos un grupo funcional da como resultado un consumo de aproximadamente el 100% del al menos un grupo funcional. En otra realización, la polimerización o reticulación de al menos un grupo funcional da como resultado un consumo de menos de aproximadamente el 100% del al menos un grupo funcional.

Tal como se usa en el presente documento, “armazón” se refiere a una estructura que comprende un material biocompatible que proporciona una superficie adecuada para la adherencia y proliferación de células. Un armazón puede proporcionar además estabilidad mecánica y soporte. Un armazón puede tener una forma o conformación particular para influir o delimitar una forma o conformación tridimensional asumida por una población de células en proliferación. Tales formas o conformaciones incluyen, pero no se limitan a, películas (por ejemplo, una forma con dos dimensiones sustancialmente mayores que la tercera dimensión), cintas, cordones, láminas, discos planos, cilindros, esferas, formas amorfas tridimensionales, etc.

Tal como se usa en el presente documento, “sustrato” se refiere a un material de soporte.

Tal como se usa en el presente documento, “superficie” se refiere a la capa más externa de un sustrato o la parte más externa del sustrato.

Tal como se usa en la presente, “modificado con tiol” se refiere a una o más modificaciones del sustrato.

Tal como se usa en el presente documento, “tratar” significa reducir la frecuencia con la que un paciente experimenta los síntomas de una enfermedad, defecto, trastorno o estado adverso, y similares.

El término “tejido”, tal como se usa en el presente documento incluye, pero no se limita a, hueso, tejido nervioso, tejido conjuntivo fibroso que incluye tendones y ligamentos, cartílago, duramadre, pericardio, músculo, pulmón, válvulas cardíacas, venas y arterias y otra vasculatura, dermis, tejido adiposo o tejido glandular.

Tal como se usa en el presente documento, “armazón” se refiere a una estructura, que comprende un material biocompatible que proporciona una superficie adecuada para la adherencia de una sustancia. Un armazón puede proporcionar además estabilidad mecánica y soporte. Un armazón puede tener una forma o conformación particular para influir o delimitar una forma o conformación tridimensional. Tales formas o conformaciones incluyen, pero no se limitan a, películas (por ejemplo, una conformación con dos dimensiones sustancialmente mayores que la tercera dimensión), cintas, cordones, láminas, discos planos, cilindros, esferas, conformaciones amorfas tridimensionales, etc.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “sujeto” y “paciente” se usan de manera intercambiable. Tal como se usa en el presente documento, un sujeto es preferiblemente un mamífero tal como un no primate (por ejemplo, vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, ratas, etc.) y un primate (por ejemplo, mono y ser humano), lo más preferiblemente un ser humano.

Tal como se usa en el presente documento, el término “tratar una enfermedad o trastorno” significa reducir la frecuencia con la que un paciente experimenta un síntoma de la enfermedad o trastorno. Enfermedad y trastorno se usan de manera intercambiable en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, el término “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad que es suficiente o eficaz para prevenir o tratar (retrasar o prevenir el inicio, prevenir la progresión, inhibir, disminuir o revertir) una enfermedad o estado descrito o contemplado en el presente documento, que incluye el alivio de los síntomas de tal enfermedad o estado.

Tal como se usa en el presente documento, el término “cantidad eficaz” o “cantidad terapéuticamente eficaz” de un compuesto es la cantidad de compuesto que es suficiente para proporcionar un efecto beneficioso al sujeto al que se administra el compuesto.

Intervalos: a lo largo de esta descripción, pueden presentarse diversos aspectos de la invención en un formato de intervalo. Debe entenderse que la descripción en formato de intervalo es meramente por conveniencia y brevedad y no debe interpretarse como una limitación inflexible del alcance de la invención. Por consiguiente, debe considerarse que la descripción de un intervalo ha revelado específicamente todos los subintervalos posibles, así como los valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, debe considerarse que la descripción de un intervalo como de 1 a 6 tiene subintervalos específicamente dados a conocer tales como desde 1 hasta 3, desde 1 hasta 4, desde 1 hasta 5, desde 2 hasta 4, desde 2 hasta 6, desde 3 hasta 6, etc., así como números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.

Descripción

La presente invención se refiere a composiciones recubiertas con un recubrimiento antitrombogénico, a métodos para preparar tales composiciones. En particular, la invención se refiere a biomateriales, a constructos de tejidos modificados por ingeniería y similares, que están recubiertos con un recubrimiento antitrombogénico.

Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la presente invención proporciona injertos vasculares recubiertos con un recubrimiento antitrombogénico. Sin embargo, la presente invención no se limita a ningún tipo particular de material o constructo. Más bien, la presente invención abarca cualquier material o constructo recubierto con el recubrimiento antitrombogénico de la invención.

La presente invención se basa en el descubrimiento de que recubrir la superficie luminal de un vaso sanguíneo descelularizado con una capa de ácido hialurónico modificado con tiol (HA modificado con tiol) o un recubrimiento multicapa de HA modificado con tiol y heparina u otras moléculas previene la trombogénesis en el vaso. Se ha investigado el tejido descelularizado para su uso como injertos vasculares. Sin embargo, los injertos descelularizados no tratados son trombogénicos, a menos que se recelularicen con células endoteliales para inhibir la formación de coágulos, que es un proceso que requiere mucho tiempo y puede limitar su aplicabilidad clínica. En una realización, la presente invención se refiere a un recubrimiento químico, en lugar de la siembra celular, para proporcionar un injerto anticoagulante antitrombogénico. En determinadas realizaciones, el recubrimiento es estable en refrigeración convencional, permitiendo de ese modo que se use una composición disponible para la venta según sea necesario.

En una realización, la invención proporciona una composición de injerto vascular antitrombogénico (reivindicación 1) que comprende un vaso sanguíneo descelularizado en el que la superficie luminal del vaso sanguíneo se recubre con una primera capa. La primera capa comprende HA modificado con tiol. En otra realización, la invención proporciona una composición de injerto vascular antitrombogénico que comprende un vaso sanguíneo descelularizado en el que la superficie luminal del vaso sanguíneo está recubierta con un recubrimiento multicapa. En determinadas realizaciones, el recubrimiento multicapa comprende una primera capa que comprende HA modificado con tiol y una segunda capa que comprende heparina. En una realización, la capa de HA modificado con tiol se reticula con la superficie luminal del vaso. En una realización, la capa de heparina se reticula con la capa de HA modificado con tiol. En determinadas realizaciones, una o más capas del recubrimiento comprenden un hidrogel.

En una realización, la invención proporciona un método para elaborar una composición recubierta con un recubrimiento antitrombogénico. En determinadas realizaciones, el método comprende recubrir una superficie de un sustrato con una primera capa. En una realización, el sustrato es un tejido descelularizado. Sin embargo, la invención no se limita a ningún tipo particular de sustrato. Más bien, el método abarca cualquier sustrato adecuado conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, vasos sanguíneos nativos, vasos sanguíneos modificados por ingeniería, injertos vasculares sintéticos elaborados de polímeros y catéteres en contacto con la sangre elaborados de polímeros. La primera capa comprende HA modificado con tiol. En determinadas realizaciones, el método comprende usar un agente reticulante que comprende éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) y maleimida para reticular los grupos amina del sustrato con los grupos sulfhidrido del HA. En determinadas realizaciones, el método comprende un procedimiento de recubrimiento capa por capa. En una realización, el método comprende recubrir el sustrato con una segunda capa. En determinadas realizaciones, la segunda capa se recubre sobre la primera capa. Por ejemplo, en una realización, la segunda capa comprende heparina aminada, que se reticula con el HA de la primera capa.

El injerto vascular recubierto puede usarse, por ejemplo, para tratar a un sujeto que tiene un vaso sanguíneo enfermo o bloqueado. En determinadas realizaciones, el injerto vascular recubierto se usa para tratar un aneurisma. En otra realización, el injerto vascular recubierto se usa para sortear un vaso enfermo o bloqueado. En otra realización, el injerto vascular recubierto se usa para proporcionar acceso vascular en un sujeto que se somete o se prevé que se someta a hemodiálisis.

Composición

La presente invención proporciona una composición que comprende una superficie recubierta con un recubrimiento antitrombogénico (reivindicación 1). En determinadas realizaciones, la composición comprende un biomaterial, sustrato de modificación de tejidos por ingeniería, órgano artificial o tejido artificial que tiene al menos una superficie recubierta con un recubrimiento antitrombogénico.

En una realización, la composición de la invención comprende un injerto vascular que tiene al menos una superficie recubierta con un recubrimiento antitrombogénico. En una realización, el injerto vascular es un injerto vascular tubular que tiene una superficie exterior, una superficie interior o luminal y un paso hueco. Los injertos vasculares tubulares de la invención son biocompatibles, debidamente proporcionados en cuanto a las dimensiones apropiadas, tales como el diámetro, la longitud y el grosor de la pared, pueden unirse fácilmente al tejido vivo previsto, tal como mediante suturas, y ofrecen características de manipulación adecuadas, tales como buena flexibilidad, flexión y resistencia al acodamiento durante la flexión. En determinadas realizaciones, el injerto vascular tubular de la invención es un conducto a través del cual pueden fluir los líquidos corporales (por ejemplo, sangre). Por tanto, la superficie luminal del injerto vascular tubular es la superficie interior del injerto que, cuando se implanta, está en contacto con el líquido. Por tanto, estos injertos vasculares tubulares pueden usarse para reemplazar segmentos de vasos nativos, o de otro modo pueden usarse como vasos artificiales que sirven para sortear los vasos nativos. En otra realización, los injertos vasculares tubulares se usan como puntos de acceso vascular. En determinadas realizaciones, el injerto vascular tubular de la invención tiene propiedades mecánicas sustancialmente similares a las de los vasos sanguíneos nativos. Es decir, los injertos vasculares tienen la fuerza de la pared para soportar la presión dentro del vaso. En una realización, la superficie luminal del injerto vascular tubular se recubre con un recubrimiento no trombogénico. El recubrimiento evita la adhesión de plaquetas y la trombosis.

En determinadas realizaciones, el injerto vascular tubular de la invención tiene un diámetro interior, un diámetro exterior, una longitud y un grosor de pared según sea necesario para imitar el vaso nativo que está reparándose, reemplazándose o sorteándose. Por ejemplo, en una realización, el injerto vascular tubular de la invención es un injerto vascular de pequeño calibre, que tiene un diámetro interior de menos de 5 cm.

En una realización, el injerto vascular tubular de la invención tiene un diámetro interior de aproximadamente [1] mm a aproximadamente [25] mm.

En una realización, el injerto vascular tubular de la invención tiene un diámetro exterior de aproximadamente [1] mm a aproximadamente [25] mm.

En una realización, el injerto vascular tubular de la invención tiene un grosor de pared de aproximadamente [100] μ m a aproximadamente [2] mm.

En una realización, el injerto vascular tubular de la invención tiene una longitud de aproximadamente [4] cm a aproximadamente [100] cm.

En otra realización, el injerto vascular de la invención es un injerto de lámina. Los injertos de lámina de la invención pueden usarse, por ejemplo, para reparar porciones de vasos sanguíneos nativos. Como tal, el injerto de lámina comprende una superficie luminal que, cuando se administra al vaso nativo, está en contacto con el líquido que fluye a través del vaso. En una realización, la superficie luminal del injerto de lámina se recubre con un recubrimiento no trombogénico.

En determinadas realizaciones, la composición de la invención comprende un sustrato, en el que la superficie

comprende al menos una superficie recubierta con un recubrimiento no trombogénico. El sustrato puede ser cualquier material o biomaterial conocido en la técnica. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el sustrato es una composición de proteína de matriz extracelular, una composición a base de colágeno, una composición a base de elastina, hidrogel, armazón electrohilado, armazones poliméricos moldeados por inyección, armazones poliméricos tejidos y no tejidos, implantes a base de metal, biomateriales compuestos de cerámica u otro sustrato de modificación de tejidos por ingeniería.

En una realización, el sustrato es tejido descelularizado. Los sustratos de tejido descelularizados son sustratos obtenidos de la recogida de tejido de una fuente donante y la retirada de células y restos celulares del tejido recogido. Los sustratos de tejido descelularizados retienen la estructura del tejido recogido y posteriormente pueden usarse como de modificación de tejidos por ingeniería que van a implantarse en un sujeto que lo necesita. Los métodos para producir sustratos de tejido descelularizados se conocen bien en la técnica. La presente invención no se limita a ningún tipo particular de tejido descelularizado o la manera en que se produjo el tejido descelularizado.

En determinadas realizaciones, la descelularización se basa en una metodología química. En algunos casos, la descelularización comprende una metodología química combinada con medios mecánicos para retirar células del tejido. En un aspecto, la disolución química o de otro modo denominada disolución de descelularización usada para la descelularización incluye generalmente al menos una disolución hipertónica, un detergente y un agente quelante. En determinadas realizaciones, la disolución hipertónica es una disolución hipertónica de cloruro de sodio. En determinadas realizaciones, el detergente es un detergente bipolar tal como CHAPS. En determinadas realizaciones, el agente quelante es EDTA.

En una realización, la disolución de descelularización puede incluir un tampón (por ejemplo, PBS) para compatibilidad osmótica con las células. En algunos casos, la disolución de descelularización también puede incluir enzimas tales como, sin limitación, una o más colagenasas, una o más dispasas, una o más ADNasas o una proteasa tal como tripsina. En algunos casos, la disolución de descelularización también o alternativamente puede incluir inhibidores de una o más enzimas (por ejemplo, inhibidores de proteasa, inhibidores de nucleasa y/o inhibidores de colagenasa).

En determinados casos, un método para producir un sustrato de tejido descelularizado incluye perfundir el tejido con la disolución de descelularización. La presión para la que se perfunde la disolución de descelularización a través del tejido puede ajustarse a la presión deseada. En una realización, la disolución de descelularización se perfunde a través del tejido a una presión de perfusión por debajo de aproximadamente 30 mmHg. En una realización, la disolución de descelularización se perfunde a través del tejido a presiones de menos de aproximadamente 20 mmHg.

En determinadas realizaciones, el sustrato de tejido descelularizado es un vaso sanguíneo descelularizado. Por ejemplo, un vaso sanguíneo descelularizado puede servir como sustrato para injertos vasculares tubulares descritos en otra parte en el presente documento. En una realización, la disolución de descelularización puede introducirse en un vaso sanguíneo para efectuar la retirada de células. En determinadas realizaciones, la descelularización de los vasos sanguíneos retira el revestimiento de endotelio nativo del vaso.

En una realización, el tejido descelularizado de la invención consiste esencialmente en el componente de matriz extracelular (*extracellular matrix*, ECM) de todas o la mayoría de las regiones del tejido. Los componentes de ECM pueden incluir cualquiera o todos los siguientes: fibronectina, fibrilina, laminina, elastina, miembros de la familia del colágeno (por ejemplo, colágeno I, III y IV), glicosaminoglicanos, sustancia fundamental, fibras reticulares y trombospondina, que pueden permanecer organizadas como estructuras definidas tales como la lámina basal. La descelularización exitosa se define como la ausencia de miofilamentos, células endoteliales, células de músculo liso, células epiteliales y núcleos detectables en cortes histológicos mediante procedimientos de tinción histológica convencionales. Preferiblemente, pero no necesariamente, los restos celulares residuales también se han retirado del tejido descelularizado.

En una realización, el proceso de descelularización de un tejido natural conserva la estructura tridimensional nativa del tejido. Es decir, la morfología y la arquitectura del tejido, incluyendo los componentes de ECM, se mantienen durante y después del proceso de descelularización. La morfología y la arquitectura de ECM pueden examinarse visualmente y/o histológicamente. Por ejemplo, la lámina basal de la superficie exterior de un órgano sólido o dentro de la vasculatura de un órgano o tejido no debe retirarse ni dañarse significativamente debido a la descelularización. Además, las fibrillas de ECM deben ser similares a las de un órgano o tejido que no se ha descelularizado o sin cambios significativos.

En una realización, pueden aplicarse uno o más compuestos en o sobre un tejido descelularizado para, por ejemplo, preservar el tejido descelularizado o para preparar el tejido descelularizado para recelularización y/o para ayudar o estimular las células durante el proceso de recelularización. Tales compuestos incluyen, pero no se limitan a, uno o más factores de crecimiento (por ejemplo, VEGF, DKK-1, FGF, BMP-1, BMP-4, SDF-1, IGF y HGF), agentes inmunomoduladores (por ejemplo, citocinas, glucocorticoides, antagonista de IL2R, antagonistas de leucotrieno) y/o factores que modifican la cascada de la coagulación (por ejemplo, aspirina, proteínas de unión a heparina y heparina). Además, un órgano o tejido descelularizado puede tratarse adicionalmente con, por ejemplo, irradiación

(por ejemplo, UV, gamma) para reducir o eliminar la presencia de cualquier tipo de microorganismo que quede sobre o dentro de un tejido descelularizado.

Se usan métodos de descelularización a modo de ejemplo para generar un tejido descelularizado proporciona una forma controlada y precisa de destruir las células de un tejido, mientras se deja intacta la ECM subyacente, incluyendo la vascularización, y otras características morfológicas generales del tejido original. En determinadas realizaciones, los sustratos descelularizados son adecuados para sembrar con células apropiadas. En una realización, los sustratos descelularizados no se siembran con células. En determinadas realizaciones, los sustratos descelularizados se recubren con un recubrimiento no trombogénico descrito en otra parte en el presente documento. Cuando el proceso se realiza *in vitro*, el tejido descelularizado es adecuado para su implante en el receptor como tejido de reemplazo. La presente invención incluye métodos de fabricación de tejidos modificados por ingeniería a partir de dichos sustratos.

Aunque la fuente del tejido no está limitada, en las realizaciones a modo de ejemplo, el tejido es de un animal relativamente grande o un animal reconocido por tener una anatomía similar (con respecto al tejido de interés) a la de un ser humano, tal como un cerdo, un vaca, caballo, mono o simio. En algunas realizaciones, la fuente del tejido es humana, cuyo uso puede reducir la posibilidad de rechazo de tejidos modificados por ingeniería basados en el armazón. En determinadas realizaciones, el tejido se modifica por ingeniería *in vitro* a partir de células y luego se somete a descelularización. En determinadas realizaciones, el tejido es un vaso sanguíneo obtenido del animal. Puede usarse cualquier vaso sanguíneo adecuado para producir el sustrato de vaso sanguíneo descelularizado. Por ejemplo, en una realización, el sustrato descelularizado producido a partir de la aorta, o parte de la misma, obtenido del animal donante o de arteria coronaria, vena safena, arteria tibial posterior, arteria pulmonar, arteria iliaca externa, arteria mamaria inferior derecha, arteria radial.

La composición de la invención comprende al menos una superficie recubierta con un recubrimiento no trombogénico. En determinadas realizaciones, el recubrimiento no trombogénico evita la adhesión y activación de las plaquetas, reduciendo así la trombosis. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el recubrimiento evita el acceso de colágeno u otros componentes trombogénicos que pueden estar presentes en el sustrato al torrente sanguíneo. En una realización, el recubrimiento de la invención es un recubrimiento de una sola capa. En otra realización, el recubrimiento de la invención es un recubrimiento multicapa. En una realización, el recubrimiento comprende una capa de hidrogel. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la composición comprende una primera capa que comprende un hidrogel reticulado con el sustrato. En ocasiones, la primera capa se denomina en el presente documento capa de hidrogel. La capa de hidrogel comprende ácido hialurónico modificado con tiol (HA).

El hidrogel puede comprender cualquier biopolímero o polímero sintético conocido en la técnica. Por ejemplo, el hidrogel puede comprender hialuronanos, quitosanos, alginatos, colágeno, dextrano, pectina, carragenano, polilisina, gelatina o agarosa (véase: W. E. Hennink y C. F. van Nostrum, 2002, Adv. Drug Del. Rev. 54, 13-36 y A. S. Hoffman, 2002, Adv. Drug Del. Rev. 43, 3-12). Estos materiales consisten en cadenas de esqueleto de alto peso molecular elaboradas de polisacáridos o polipéptidos lineales o ramificados. Los ejemplos de hidrogeles basados en polímeros sintéticos incluyen, pero no se limitan a, (met)acrilato-oligolactida-PEO-oligolactida-(met)acrilato, poli(etilenglicol) (PEO), poli(propilenglicol) (PPO), copolímeros de PEO-PPO-PEO (Pluronic), poli(fosfaceno), poli(metacrilatos), poli(N-vinilpirrolidona), copolímeros de PL(G)A-PEO-PL(G)A, poli(etilenimina), etc. (véase A. S. Hoffman, 2002 Adv. Drug Del. Rev. 43, 3-12).

Los hidrogeles generalmente pueden absorber una gran cantidad de líquido y, en el equilibrio, normalmente se componen del 60-90% de líquido y solo el 10-30% de polímero. En una realización preferida, el contenido de agua del hidrogel es aproximadamente del 70-80%. Los hidrogeles son particularmente útiles debido a la biocompatibilidad inherente de la red polimérica reticulada (Hill-West, *et al.*, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 5967-5971). La biocompatibilidad del hidrogel puede atribuirse a la hidrofilia y la capacidad de absorber grandes cantidades de líquidos biológicos (Brannon-Peppas. Preparation and Characterization of Cross-linked Hydrophilic Networks in Absorbent Polymer Technology, Brannon-Peppas y Harland, Eds. 1990, Elsevier: Amsterdam, págs. 45-66; Peppas y Mikos. Preparation Methods and Structure of Hydrogels in Hydrogels in Medicine and Pharmacy, Peppas, Ed. 1986, CRC Press: Boca Raton, Fla., págs. 1-27). Los hidrogeles pueden prepararse reticulando biopolímeros hidrófilos o polímeros sintéticos. Los ejemplos de los hidrogeles formados a partir de la reticulación física o química de biopolímeros hidrófilos incluyen, pero no se limitan a, hialuronanos, quitosanos, alginatos, colágeno, dextrano, pectina, carragenano, polilisina, gelatina o agarosa (véase: WE Hennink y CF van Nostrum, 2002, Adv. Drug Del. Rev. 54, 13-36 y A. S. Hoffman, 2002, Adv. Drug Del. Rev. 43, 3-12). Estos materiales consisten en cadenas de esqueleto de alto peso molecular elaboradas de polisacáridos o polipéptidos lineales o ramificados. Los ejemplos de hidrogeles basados en polímeros sintéticos de reticulación química o física incluyen pero no se limitan a (met)acrilato-oligolactida-PEO-oligolactida-(met)acrilato, polietilenglicol (PEO), poli(propilenglicol) (PPO), copolímeros de PEO-PPO-PEO (Pluronic), poli(fosfaceno), poli(metacrilatos), poli(N-vinilpirrolidona), copolímeros de PL(G)A-PEO-PL(G)A, poli(etilenimina), etc. (véase A. S. Hoffman, 2002 Adv. Drug Del. Rev. 43, 3-12). En algunas realizaciones, el armazón de hidrogel transparente comprende diacrilato de poli(etilenglicol) (PEGDA).

Los hidrogeles se parecen mucho a la matriz extracelular viviente natural (Ratner y Hoffman. Synthetic Hydrogels for Biomedical Applications in Hydrogels for Medical and Related Applications, Andrade, Ed. 1976, American Chemical

Society: Washington, D.C., págs. 1-36). Los hidrogeles también pueden volverse degradables *in vivo* incorporando polímeros de PLA, PLGA o PGA. Además, los hidrogeles pueden modificarse con fibronectina, laminina, vitronectina o, por ejemplo, RGD para la modificación de la superficie, que puede promover la adhesión y la proliferación celular (Heungsoo Shin, 2003, Biomaterials 24: 4353-4364; Hwang *et al.*, 2006 Tissue Ing. 12:2695-706). De hecho, la alteración de los pesos moleculares, las estructuras de bloques, los enlaces degradables y los modos de reticulación pueden influir en la resistencia, la elasticidad y las propiedades de degradación de los hidrogeles presentes (Nguyen y West, 2002, Biomaterials 23 (22): 4307-14; Ifkovits y Burckick, 2007, Tissue Eng. 13(10):2369-85).

En determinadas realizaciones, el hidrogel de la invención está reticulado. La reticulación del hidrogel puede realizarse usando cualquier método adecuado conocido en la técnica. En determinadas realizaciones, pueden utilizarse uno o más agentes de reticulación multifuncionales como restos reactivos que unen covalentemente biopolímeros o polímeros sintéticos. Tales agentes de reticulación bifuncionales pueden incluir glutaraldehído, epóxidos (por ejemplo, bis-oxiranos), dextrano oxidado, hidrazida de p-azidobenzoílo, éster de N-[α -maleimidoacetoxi]succinimida, p-azidofenilgloxal monohidratado, disulfuro de bis-[β -(4-azidosalicilamido)etilo], suberato de bis[sulfosuccinimidilo], propionato de ditiobis[succinimidilo], suberato de disuccinimidilo, clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS) y otros reactivos de reticulación bifuncionales conocidos por los expertos en la técnica. En determinadas realizaciones, el hidrogel comprende un agente de reticulación fotoactivado. En una realización, uno o más componentes del hidrogel se reticula tras la exposición a la luz UV.

En determinadas realizaciones, el hidrogel se reticula usando un agente reticulante heterobifuncional que comprende NHS y maleimida. En una realización particular, el agente reticulante une la capa de hidrogel directamente al sustrato. Por ejemplo, en una realización, la NHS reacciona con los grupos amina en el sustrato del vaso descelularizado, mientras que la maleimida reacciona con los grupos sulfhidrilo en el HA modificado con tiol (figura 1).

En determinadas realizaciones, el hidrogel se reticula usando un agente reticulante homobifuncional que comprende grupos reactivos de imidoéster tales como el agente reticulante de DMA (adipimidato de dimetilo•2 HCl), que es reactivo frente a grupos amina. En una realización particular, el agente reticulante une la capa de hidrogel directamente al sustrato. Por ejemplo, en una realización, el imidoéster reacciona con los grupos amina en el sustrato del vaso descelularizado y los grupos amina en el HA modificado con dihidrazida.

En determinadas realizaciones, el hidrogel se reticula usando un agente reticulante de EDC/NHS que reticula los grupos carboxilo y amina. En una realización particular, el agente reticulante une la capa de hidrogel directamente al sustrato. Por ejemplo, en una realización, el EDC/NHS reacciona con los grupos carboxilo del HA sin modificar y los grupos amina en el sustrato del vaso descelularizado.

En determinadas realizaciones, pueden utilizarse uno o más agentes de reticulación multifuncionales como restos reactivos que unen covalentemente biopolímeros o polímeros sintéticos. Tales agentes de reticulación bifuncionales pueden incluir glutaraldehído, epóxidos (por ejemplo, bis-oxiranos), dextrano oxidado, hidrazida de p-azidobenzoílo, éster de N-[α -maleimidoacetoxi]succinimida, p-azidofenilgloxal monohidratado, disulfuro de bis-[β -(4-azidosalicilamido)etilo], suberato de bis[sulfosuccinimidilo], propionato de ditiobis[succinimidilo], suberato de disuccinimidilo, clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS) y otros reactivos de reticulación bifuncionales conocidos por los expertos en la técnica.

En otra realización que utiliza un agente de reticulación, pueden usarse materiales poliactilados, tales como triactilato de trimetilpropano etoxilado (20), como agente de reticulación fotoactivado no específico. Los componentes de una mezcla de reacción a modo de ejemplo incluirían un hidrogel termorreversible mantenido a 39°C, monómeros de poliactilato, tales como triactilato de trimetilpropano etoxilado (20), un fotoiniciador, tal como eosina Y, agentes catalíticos, tales como 1-vinil-2-pirrolidinona y trietanolamina. La exposición continua de esta mezcla reactiva a luz de longitud de onda larga (> 498 nm) produciría una red de hidrogel reticulado.

La matriz de hidrogel reticulado estabilizada de la presente invención puede estabilizarse y potenciarse aún más mediante la adición de uno o más agentes potenciadores. Por "agente potenciador" o "agente estabilizante" se entiende cualquier compuesto añadido a la matriz de hidrogel, además de los componentes de alto peso molecular, que potencia la matriz de hidrogel proporcionando estabilidad o ventajas funcionales adicionales. Los agentes potenciadores adecuados, que se mezclan con los componentes de alto peso molecular y se dispersan dentro de la matriz de hidrogel, incluyen muchos de los aditivos descritos anteriormente en relación con la matriz termorreversible comentada anteriormente. El agente potenciador puede incluir cualquier compuesto, especialmente compuestos polares que, cuando se incorporan a la matriz de hidrogel reticulado, potencian la matriz de hidrogel proporcionando estabilidad o ventajas funcionales adicionales.

Los agentes potenciadores preferidos para su uso con la matriz de hidrogel reticulado estabilizada incluyen aminoácidos polares, análogos de aminoácidos, derivados de aminoácidos, colágeno intacto y quelantes de cationes divalentes, tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o sales del mismo. Se pretende que los aminoácidos polares incluyan tirosina, cisteína, serina, treonina, asparagina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutámico, arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos polares preferidos son L-cisteína, ácido L-glutámico, L-lisina y L-arginina. Las

concentraciones adecuadas de cada agente potenciador preferido particular son las mismas que las indicadas anteriormente en relación con la matriz de hidrogel termorreversible. Los aminoácidos polares, EDTA y mezclas de los mismos son agentes potenciadores preferidos. Además, los geles pueden cargarse con factores de crecimiento: factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y/o factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), VEGF o bFGF se incorpora al gel de ácido hialurónico antes de la adición del agente reticulante. La reticulación procede entonces sin otras modificaciones que atrapen los factores de crecimiento dentro de los geles de ácido hialurónico. Esto promueve la reendotelización de los geles por las células endoteliales vecinas del sitio de implante. Los factores de crecimiento pueden añadirse a una concentración de 50 ng/cm² de área del vaso que va a reticularse. Los agentes potenciadores también pueden añadirse a la composición de la matriz durante la reticulación de los componentes de alto peso molecular.

Los agentes potenciadores son particularmente importantes en la matriz de hidrogel bioactivo reticulado estabilizada debido a las propiedades inherentes que promueven dentro de la matriz. La matriz de hidrogel presenta una bioactividad intrínseca que se hará más evidente a través de las realizaciones adicionales descritas a continuación en el presente documento. Se cree que la bioactividad intrínseca es una función de la esteoquímica única de las macromoléculas reticuladas en presencia de los aminoácidos polares potenciadores y fortalecedores, así como otros agentes potenciadores.

En una realización, la capa de hidrogel puede comprender uno o más agentes terapéuticos. Por ejemplo, pueden incrustarse uno o más agentes terapéuticos dentro de la capa de hidrogel. En otra realización, la capa de hidrogel puede modificarse con grupos funcionales para unir covalentemente una variedad de proteínas (por ejemplo, colágeno) o compuestos tales como agentes terapéuticos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, analgésicos, anestésicos, antifúngicos, antibióticos, antiinflamatorios, antihelmínticos, antidotos, antieméticos, antihistamínicos, antihipertensivos, antipalúdicos, antimicrobianos, antipsicóticos, antipiréticos, antisépticos, antiartríticos, antituberculóticos, antitusígenos, antivirales, fármacos cardioactivos, catárticos, agentes quimioterápicos, un agente de obtención de imágenes de color o fluorescente, corticoides (tales como esteroides), antidepresivos, depresores, auxiliares para el diagnóstico, diuréticos, enzimas, expectorantes, hormonas, hipnóticos, minerales, suplementos nutricionales, parasimpaticomiméticos, suplementos de potasio, sensibilizantes a radiación, un radioisótopo, sedantes, sulfonamidas, estimulantes, simpaticomiméticos, tranquilizantes, antiinfecciosos urinarios, vasoconstrictores, vasodilatadores, vitaminas, derivados de xantina y similares. El agente terapéutico también puede ser otras moléculas orgánicas pequeñas, entidades naturalmente aisladas o sus análogos, agentes organometálicos, metales quelados o sales metálicas, fármacos basados en péptidos o agentes de unión o selección como diana de receptores peptídicos o no peptídicos o citocinas o factores crecimiento de péptidos/proteínas. Se contempla que la unión del agente terapéutico a la matriz pueda ser a través de un grupo de unión sensible a proteasa u otro enlace biodegradable. Las moléculas que pueden incorporarse a la matriz de hidrogel incluyen, pero no se limitan a, vitaminas y otros suplementos nutricionales; glicoproteínas (por ejemplo, colágeno); fibronectina; péptidos y proteínas; hidratos de carbono (simples y/o complejos); proteoglicanos; antígenos; oligonucleótidos (ADN y/o ARN sentido y/o antisentido); anticuerpos (por ejemplo, contra agentes infecciosos, tumores, fármacos u hormonas); y reactivos de terapia génica.

En determinadas realizaciones, la capa de hidrogel, recubierta a lo largo de la superficie luminal del sustrato, tiene un grosor de aproximadamente [100] nm a aproximadamente [3] mm. La capa de hidrogel se recubre con una segunda capa. Por ejemplo, en una realización, la capa de hidrogel se recubre con una segunda capa que comprende un anticoagulante. Por ejemplo, en una realización, la segunda capa comprende heparina o derivados de la misma. Sin embargo, la presente invención no se limita al uso de heparina como anticoagulante. Más bien, puede usarse cualquier anticoagulante conocido. Los anticoagulantes a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, antagonistas de la vitamina K, cumarinas, curcumina (diferuloilmetano), hirudina, heparinas, inhibidores del factor Xa, inhibidores directos de Xa, inhibidores directos de trombina, polisacáridos naturales y sintéticos basados en unidades de anhidroglucosa unidas en β -(1-4), sulfato de condroitina, glicosaminoglicanos y similares.

En una realización, la segunda capa se reticula con la primera capa. Por ejemplo, en una realización, el anticoagulante de la segunda capa se reticula con el ácido hialurónico de la primera capa (por ejemplo, capa de hidrogel). En una realización, se modifica el anticoagulante de la segunda capa, lo que en determinados casos permite una reticulación más fácil con la primera capa. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la segunda capa comprende heparina aminada, en la que la heparina comprende un grupo amina primaria. En una realización, la heparina se amina en el átomo de carbono electrófilo de la cadena de extremo ("animación en el extremo") (figura 2).

En determinadas realizaciones, la heparina aminada se reticula con el ácido hialurónico mediante EDC/NHS. Sin embargo, la composición de la invención no se limita a ningún agente reticulante en particular. Más bien, puede usarse cualquier tipo o agente reticulante conocido en la técnica que sea adecuado para reticular uno o más componentes de la primera capa con uno o más componentes de la segunda capa. En una realización, la heparina aminada de la segunda capa se reticula con los grupos carboxilo del HA de la primera capa. En otra realización, la heparina aminada se reticula con grupos tiol del HA de la primera capa. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la heparina aminada se modifica adicionalmente para contener NHS y un grupo maleimida reactivo con sulfhidrilo. Esta heparina modificada puede entonces reaccionar espontáneamente con los grupos tiol restantes del HA modificado con tiol de la primera capa (figura 2).

En una realización, la heparina de la segunda capa se extiende luminalmente, exponiendo de ese modo la secuencia de pentasacárido activo de heparina al torrente sanguíneo cuando se implanta la composición. Esta conformación evita de ese modo la activación inmediata de la coagulación.

- 5 El recubrimiento de las composiciones antitrombogénicas de la invención es biocompatible y no tóxico. Por ejemplo, en otra parte en el presente documento se demuestra que las células que están en contacto con el recubrimiento pueden sobrevivir y proliferar. Por tanto, aunque en determinadas realizaciones, las composiciones de la invención no se recelularizan antes del implante en un sujeto, las composiciones conducen a la recelularización *in vivo* de células nativas. En determinadas realizaciones, la recelularización *in vivo* degrada el recubrimiento a lo largo del tiempo.
- 10 En determinada realización, el recubrimiento de las composiciones antitrombogénicas de la invención no es inmunogénico. Es decir, el recubrimiento no induce una respuesta inmunitaria en el sujeto.

Métodos de preparación

- 15 La presente invención proporciona un método para preparar composiciones que tienen al menos una superficie recubierta con un recubrimiento no trombogénico (reivindicación 6). Tal como se comentó en otra parte en el presente documento, la composición de la invención comprende un sustrato, por ejemplo, un biomaterial, sustrato de modificación de tejidos por ingeniería o similar, en el que al menos una superficie del sustrato se recubre con un recubrimiento no trombogénico. En determinadas realizaciones, el sustrato comprende tejido descelularizado. Tal como se comenta en otra parte en el presente documento, la presente invención no se limita a ningún tejido descelularizado particular, ni se limita a ningún método particular para generar tejido descelularizado. Los métodos a modo de ejemplo para producir tejido descelularizado se comentan en otra parte en el presente documento y se conocen bien en la técnica, véanse, por ejemplo, los documentos US2012/0064050 y WO2007/025233.
- 20

- El método comprende recubrir una superficie del sustrato con el recubrimiento no trombogénico. Tal como se comentó en otra parte en el presente documento, el recubrimiento, en determinadas realizaciones, comprende un recubrimiento de una sola capa o de múltiples capas. En una realización, el método comprende perfundir el sustrato con una o más disoluciones. En determinadas realizaciones, el sustrato de tejido descelularizado se perfunde con agua, solución salina o similar, antes de la aplicación del recubrimiento no trombogénico.
- 25

- Tal como se comentó en otra parte en el presente documento, en determinadas realizaciones, la composición de la invención comprende una capa de hidrogel reticulada con un sustrato de tejido descelularizado. En una realización, el sustrato de tejido descelularizado se perfunde con una disolución que contiene reticulación. La presente invención no se limita a ningún tipo particular de agente reticulante. Más bien, puede emplearse cualquier agente reticulante adecuado conocido en la técnica. En una realización, el agente reticulante es agente reticulante de SM(PEG)nNHS-PEG-maleimida (Thermo). En una realización, el agente reticulante se disuelve en DMSO y PBS para formar una disolución de reticulación. La cantidad relativa del agente reticulante en la disolución de reticulación puede variarse según sea apropiado. En determinadas realizaciones, la concentración del agente reticulante en la disolución de reticulación es de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 500 mM. En otra realización, la concentración del agente reticulante en la disolución de reticulación es de aproximadamente 1 M a aproximadamente 100 mM. En otra realización, la concentración del agente reticulante en la disolución de reticulación es de aproximadamente 40 mM. La disolución de agente reticulante puede perfundirse luego sobre el sustrato de tejido descelularizado. Tal como se comentó en otra parte en el presente documento, en determinadas realizaciones el sustrato es un vaso sanguíneo descelularizado. En una realización, el vaso tubular descelularizado se perfunde continuamente con la disolución a través de la luz del vaso. En una realización, la disolución se perfunde en un circuito cerrado. En una realización, el sustrato se perfunde con la disolución de reticulación durante aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 2 horas. En otra realización, el sustrato se perfunde con la disolución de reticulación durante aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 24 horas. En otra realización, el sustrato se perfunde con la disolución de reticulación durante aproximadamente 30 minutos.
- 30
- 35
- 40
- 45

- En determinadas realizaciones, después de la aplicación de la disolución de reticulación, el sustrato se perfunde con una disolución de hidrogel. Tal como se comentó en otra parte en el presente documento, la disolución de hidrogel puede comprender cualquier biopolímero, polímero sintético o combinación de los mismos adecuados. La disolución de hidrogel comprende HA modificado con tiol. La disolución de hidrogel puede producirse disolviendo el HA modificado con tiol en agua u otro disolvente adecuado. En determinadas realizaciones, el disolvente se desgasifica, ya que en determinados casos, el HA se reticulará en presencia de oxígeno. En una realización, el vaso tubular descelularizado se perfunde continuamente con la disolución de hidrogel a través de la luz del vaso. En una realización, la disolución se perfunde en un circuito cerrado. En una realización, el sustrato se perfunde con la disolución de hidrogel durante de aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 8 horas. En otra realización, el sustrato se perfunde con la disolución de hidrogel durante de aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 4 horas. En otra realización, el sustrato se perfunde con la disolución de reticulación durante aproximadamente 2 horas. Después de la perfusión de la disolución de hidrogel, en determinadas realizaciones, el sustrato se aclara con agua, solución salina o similar. En determinadas realizaciones, para producir una morfología rugosa de la superficie luminal, el sustrato se perfunde con una disolución que comprende hilanidasa y colagenasa.
- 50
- 55

El sustrato se recubre con una segunda capa que comprende un anticoagulante. Por ejemplo, en una realización, la segunda capa comprende heparina o derivados de la misma. Sin embargo, la presente invención no se limita al uso de heparina como anticoagulante. Más bien, puede usarse cualquier anticoagulante conocido. Los anticoagulantes a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, antagonistas de la vitamina K, cumarinas, curcumina (diferuloilmetano), hirudina, heparinas, inhibidores del factor Xa, inhibidores directos de Xa, inhibidores directos de la trombina, polisacáridos naturales y sintéticos basados en unidades de anhidroglucosa unidas en β -(1-4) y similares. Tal como se comenta en otra parte en el presente documento, en determinadas realizaciones, la heparina se modifica. En una realización, la heparina modificada con ADH-amino se prepara disolviendo heparina en un disolvente adecuado, por ejemplo, formamida, y añadiendo dihidrazida de ácido adípico (ADH). En una realización, se añade a la mezcla cianoborohidruro de sodio acuoso. En algunas realizaciones, la mezcla se dializa a continuación. El retenido puede liofilizarse y purificarse, por ejemplo, mediante precipitación con etanol.

En determinadas realizaciones, el recubrimiento del sustrato con la segunda capa comprende en primer lugar perfundir el sustrato con una segunda disolución de reticulación. Por ejemplo, en una realización, el método comprende perfundir una segunda disolución de reticulación que comprende EDC y NHS. En una realización, la segunda disolución de reticulación comprende agua, solución salina u otro tampón adecuado. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la segunda disolución de reticulación comprende tampón NaCl/MES. En determinadas realizaciones, el EDC/NHS de la segunda disolución de reticulación permite la reticulación de la segunda capa con los grupos carboxilo del HA de la primera capa. En una realización, el sustrato se perfunde con la segunda disolución de reticulación durante de aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 2 horas. En otra realización, el sustrato se perfunde con la segunda disolución de reticulación durante de aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 1 hora. En otra realización, el sustrato se perfunde con la segunda disolución de reticulación durante aproximadamente 15 minutos.

En determinadas realizaciones, el recubrimiento del sustrato con la segunda capa comprende primero activar con una disolución de reticulación la heparina (o cualquier anticoagulante conocido) antes de la perfusión sobre el sustrato. Por ejemplo, en una realización, el método comprende la adición de agentes reticulantes heterobifuncionales tales como sulfo-SMCC que activan la heparina aminada. Esto permite que los grupos amina preactivados de la heparina se reticulen espontáneamente en grupos tiol accesibles en la primera capa. En una segunda realización, los grupos carboxilo de heparina (o cualquier anticoagulante conocido) se activan mediante una disolución de reticulación que comprende EDC y NHS. El sustrato se perfunde con la segunda disolución de reticulación durante de aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 2 horas. En otra realización, el sustrato se perfunde con la segunda disolución de reticulación durante de aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 1 hora. En otra realización, el sustrato se perfunde con la segunda disolución de reticulación durante aproximadamente 15 minutos.

En determinadas realizaciones, el recubrimiento del sustrato con la segunda capa comprende perfundir el sustrato con una disolución anticoagulante. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la disolución anticoagulante comprende una disolución de heparina. La disolución de heparina comprende heparina disuelta en un disolvente adecuado, que incluye, pero no se limita a, agua, solución salina u otro tampón. Por ejemplo, en una realización, la heparina se disuelve en tampón NaCl/MES. Tal como se describe en otra parte en el presente documento, en determinadas realizaciones, la heparina de la disolución de heparina se modifica. La cantidad de heparina en la disolución de heparina puede variarse según sea necesario. Por ejemplo, la cantidad de heparina puede, en determinados casos, depender del uso final de la composición. En determinadas realizaciones, la concentración de heparina en la disolución de heparina es [5 μ M]. En una realización, el sustrato se perfunde con la disolución de heparina durante de aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 3 horas. En otra realización, el sustrato se perfunde con la disolución de heparina durante de aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 2 horas. En otra realización, el sustrato se perfunde con la segunda disolución de reticulación durante aproximadamente 1 hora. En determinadas realizaciones, el sustrato se aclara con agua, solución salina u otro tampón adecuado después de la perfusión de la disolución de heparina.

Aunque una ventaja de la presente invención es que no se requiere recelularización, un experto en la técnica, dotado con la memoria descriptiva, reconocería que el tejido descelularizado puede recelularizarse si se desea. Por consiguiente, en determinadas realizaciones, el método comprende el cultivo *ex vivo* o *in vitro* de células sobre la superficie del sustrato o sobre el recubrimiento del sustrato. Puede inducirse la proliferación de las células cultivadas en al menos una parte de la composición. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, las células se cultivan de manera que produzcan una capa confluyente de células sobre la superficie luminal de una composición de injerto vascular descrita en el presente documento. Las células también pueden diferenciarse *in vitro* cultivando las células en diferenciación.

Alternativamente, las células pueden diferenciarse *in vivo* cuando establecen contacto con un tejido dentro del mamífero o cuando las células están lo suficientemente cerca de un tejido para ser influenciadas por sustancias (por ejemplo, factores de crecimiento, enzimas u hormonas) liberadas del tejido.

Tal como se describe en otra parte en el presente documento, en determinadas realizaciones, el sustrato de la composición es tejido descelularizado. Por tanto, en determinadas realizaciones, el método comprende recelularizar el sustrato.

El número de células que se introduce en un órgano descelularizado para generar un órgano o tejido depende tanto del órgano (por ejemplo, qué órgano, el tamaño y peso del órgano) como del tejido y del tipo y etapa de desarrollo de las células regenerativas. Los diferentes tipos de células pueden tener diferentes tendencias en cuanto a la densidad de población que alcanzarán esas células. De manera similar, pueden celularizarse diferentes órganos o tejidos a diferentes densidades. A modo de ejemplo, un órgano o tejido descelularizado puede sembrarse con al menos aproximadamente 1.000 (por ejemplo, al menos 10.000, 100.000, 1.000.000, 10.000.000 o 100.000.000) células regenerativas; o puede tener desde aproximadamente 1.000 células/mg de tejido (peso húmedo, es decir, antes de la descelularización) hasta aproximadamente 10.000.000 células/mg de tejido (peso húmedo) unidas al mismo.

Las células pueden introducirse en un órgano o tejido descelularizado mediante inyección en una o más ubicaciones. Además, puede introducirse más de un tipo de célula (es decir, un cóctel de células) en un órgano o tejido descelularizado. Por ejemplo, puede inyectarse un cóctel de células en múltiples posiciones en un órgano o tejido descelularizado o pueden inyectarse diferentes tipos de células en diferentes porciones de un órgano o tejido descelularizado. Alternativamente, o además de la inyección, pueden introducirse células regenerativas o un cóctel de células mediante perfusión en un órgano o tejido descelularizado canulado. Por ejemplo, las células pueden perfundirse en un órgano descelularizado usando un medio de perfusión, que luego puede cambiarse a un medio de expansión y/o diferenciación para inducir el crecimiento y/o diferenciación de las células regenerativas. En el caso de un tejido pulmonar, las células pueden introducirse en uno o ambos compartimentos de las vías respiratorias a través de la tráquea, o en el compartimento vascular a través de la arteria o vena pulmonar.

Durante la recelularización, un órgano o tejido se mantiene en condiciones en las que al menos algunas de las células regenerativas pueden multiplicarse y/o diferenciarse dentro y sobre el órgano o tejido descelularizado. Esas condiciones incluyen, sin limitación, la temperatura y/o presión apropiadas, la actividad eléctrica y/o mecánica, la fuerza, las cantidades apropiadas de O₂ y/o CO₂, una cantidad apropiada de humedad y condiciones estériles o casi estériles. Durante la recelularización, el órgano o tejido descelularizado y las células unidas al mismo se mantienen en un entorno adecuado. Por ejemplo, las células pueden requerir un suplemento nutricional (por ejemplo, nutrientes y/o una fuente de carbono tal como glucosa), hormonas exógenas o factores de crecimiento y/o un pH particular.

Las células pueden ser alogénicas para un órgano o tejido descelularizado (por ejemplo, un órgano o tejido descelularizado humano sembrado con células humanas), o las células regenerativas pueden ser xenogénicas para un órgano o tejido descelularizado (por ejemplo, un órgano o tejido descelularizado de cerdo sembrado con células humanas).

En algunos casos, un órgano o tejido generado por los métodos descritos en el presente documento debe trasplantarse a un paciente. En esos casos, las células usadas para recelularizar un órgano o tejido descelularizado pueden obtenerse del paciente de manera que las células regenerativas sean autólogas para el paciente. Las células de un paciente pueden obtenerse, por ejemplo, de sangre, médula ósea, tejidos u órganos en diferentes etapas de la vida (por ejemplo, prenatal, neonatal o perinatal, durante la adolescencia o en la edad adulta) usando métodos conocidos en la técnica. Alternativamente, las células usadas para recelularizar un órgano o tejido descelularizado pueden ser singénicas (es decir, de un gemelo idéntico) al paciente, las células pueden ser células compatibles con el antígeno linfocitario humano (*human lymphocyte antigen*, HLA) de, por ejemplo, un pariente del paciente o un individuo compatible con HLA no relacionado con el paciente, o las células pueden ser alogénicas para el paciente de, por ejemplo, un donante no compatible con HLA.

Independientemente de la fuente de las células (por ejemplo, autólogas o no), el órgano sólido descelularizado puede ser autólogo, alogénico o xenogénico para un paciente.

En determinados casos, un tejido descelularizado puede recelularizarse con células *in vivo* (por ejemplo, después de que el tejido se haya trasplantado a un individuo). La recelularización *in vivo* puede realizarse tal como se describe anteriormente (por ejemplo, inyección y/o perfusión) con, por ejemplo, cualquiera de las células descritas en el presente documento. Alternativa o adicionalmente, la siembra *in vivo* de un órgano o tejido descelularizado con células endógenas puede producirse de manera natural o estar mediada por factores suministrados al tejido recelularizado.

Composiciones para su uso

La presente invención proporciona enfoques terapéuticos (reivindicación 8): las composiciones antitrombogénicas (por ejemplo, injertos vasculares antitrombogénicos) para su uso. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, los injertos vasculares antitrombogénicos de la invención se usan en métodos para reemplazar o sortear vasos sanguíneos dañados o enfermos en un sujeto. En determinadas realizaciones, los métodos se usan para tratar un aneurisma en un sujeto. En otra realización, los métodos se usan para reemplazar o sortear vasos que proporcionan un flujo sanguíneo inadecuado.

En determinadas realizaciones, puede tratarse un sujeto que tiene un vaso sanguíneo enfermo. Por ejemplo, enfermedades o trastornos a modo de ejemplo tratados mediante el presente método incluyen, pero no se limitan a, enfermedad vascular periférica, aterosclerosis, aneurisma o trombosis venosa. En una realización, el sujeto es un

mamífero. En una realización, el sujeto es un ser humano.

El injerto de los sustratos y composiciones de la invención en un órgano o tejido que va a aumentarse puede realizarse según los métodos descritos en el presente documento o según métodos reconocidos en la técnica. La composición puede injertarse en un órgano o tejido del sujeto suturando el material de injerto al órgano diana.

5 Implantar un constructo de nuevos órganos para el reemplazo total de órganos puede realizarse según los métodos descritos en el presente documento o según métodos quirúrgicos reconocidos en la técnica.

En determinadas realizaciones, los injertos vasculares de la invención se suturan a los vasos sanguíneos existentes del sujeto. Por ejemplo, un injerto vascular antitrombogénico descrito en el presente documento puede tener el tamaño y la forma apropiados para imitar o reemplazar un vaso sanguíneo particular dañado o anómalo del sujeto.

10 En determinadas realizaciones, la región del vaso sanguíneo nativo que va a reemplazarse se extirpa quirúrgicamente del sujeto. Los extremos del injerto vascular de la invención pueden luego suturarse al vaso restante.

Los injertos vasculares de esta invención pueden usarse en lugar de cualquier derivación de corriente o injerto de derivación, o bien natural o bien artificial, en cualquier aplicación. Por tanto, pueden usarse para, sin limitación, derivación arterial, tanto de la variedad cardíaca como para tratar la enfermedad vascular periférica (*peripheral vascular disease*, PVD). Un injerto de esta invención también puede usarse como reemplazo o sustituto de una fístula creada para su uso en hemodiálisis. Además, el injerto vascular de la presente invención puede usarse para reemplazar un vaso sanguíneo dañado, tal como arterias de las extremidades dañadas por traumatismo.

15 Los injertos vasculares de esta invención pueden usarse en lugar de cualquier derivación de corriente o injerto de derivación, o bien natural o bien artificial, en cualquier aplicación. Por tanto, pueden usarse para, sin limitación, derivación arterial, tanto de la variedad cardíaca como para tratar la enfermedad vascular periférica (*peripheral vascular disease*, PVD). Un injerto de esta invención también puede usarse como reemplazo o sustituto de una fístula creada para su uso en hemodiálisis. Además, el injerto vascular de la presente invención puede usarse para reemplazar un vaso sanguíneo dañado, tal como arterias de las extremidades dañadas por traumatismo.

En determinadas realizaciones, el método de la invención comprende el implante del injerto de la invención para proporcionar una comunicación o injerto arteriovenoso artificial para su uso por pacientes en diálisis. En la hemodiálisis, la sangre de un paciente se "limpia" pasándola a través de un dializador, que consiste en dos cámaras separadas por una fina membrana. La sangre pasa a través de la cámara en un lado de la membrana y el líquido de diálisis circula por el otro. Los materiales de desecho de la sangre pasan a través de la membrana al líquido de diálisis, que se desecha y la sangre "limpia" se recircula al torrente sanguíneo. El acceso al torrente sanguíneo puede ser externo o interno. El acceso externo implica dos catéteres, uno colocado en una arteria y otro en una vena. Con mayor frecuencia, y preferiblemente, se proporciona acceso interno. Esto se logra mediante una fístula arteriovenosa o un injerto AV. Una fístula AV implica la unión quirúrgica de una arteria y una vena debajo de la piel. El aumento del volumen de sangre estira la vena elástica para permitir un mayor volumen de flujo sanguíneo. Se colocan agujas en la fístula de modo que la sangre pueda extraerse para la diálisis y luego la sangre se devuelve a través de la vena dilatada.

20 En determinadas realizaciones, el método de la invención comprende el implante del injerto de la invención para proporcionar una comunicación o injerto arteriovenoso artificial para su uso por pacientes en diálisis. En la hemodiálisis, la sangre de un paciente se "limpia" pasándola a través de un dializador, que consiste en dos cámaras separadas por una fina membrana. La sangre pasa a través de la cámara en un lado de la membrana y el líquido de diálisis circula por el otro. Los materiales de desecho de la sangre pasan a través de la membrana al líquido de diálisis, que se desecha y la sangre "limpia" se recircula al torrente sanguíneo. El acceso al torrente sanguíneo puede ser externo o interno. El acceso externo implica dos catéteres, uno colocado en una arteria y otro en una vena. Con mayor frecuencia, y preferiblemente, se proporciona acceso interno. Esto se logra mediante una fístula arteriovenosa o un injerto AV. Una fístula AV implica la unión quirúrgica de una arteria y una vena debajo de la piel. El aumento del volumen de sangre estira la vena elástica para permitir un mayor volumen de flujo sanguíneo. Se colocan agujas en la fístula de modo que la sangre pueda extraerse para la diálisis y luego la sangre se devuelve a través de la vena dilatada.

Un injerto AV puede usarse en personas cuyas venas, por una razón u otra, no son adecuadas para una fístula AV. Un injerto AV implica el injerto quirúrgico de una vena donante de la propia vena safena del paciente, una arteria carótida de una vaca o un injerto sintético de una arteria a una vena del paciente. Una de las principales complicaciones de un injerto AV sintético es la trombosis y la proliferación de células neointimales que provocan el cierre del injerto.

35 Un injerto AV puede usarse en personas cuyas venas, por una razón u otra, no son adecuadas para una fístula AV. Un injerto AV implica el injerto quirúrgico de una vena donante de la propia vena safena del paciente, una arteria carótida de una vaca o un injerto sintético de una arteria a una vena del paciente. Una de las principales complicaciones de un injerto AV sintético es la trombosis y la proliferación de células neointimales que provocan el cierre del injerto.

Tal como se describe en otra parte en el presente documento, un beneficio de los injertos vasculares de la invención es que no son trombogénicos sin necesidad de sembrar el injerto con las células del sujeto o del donante. Como tal, los injertos pueden implantarse en el momento en que sea necesario. Es decir, no se necesita tiempo de espera para preparar los injertos. Los injertos de la invención son estables durante la refrigeración convencional y, por tanto, pueden servir como composición disponible para la venta.

40 Tal como se describe en otra parte en el presente documento, un beneficio de los injertos vasculares de la invención es que no son trombogénicos sin necesidad de sembrar el injerto con las células del sujeto o del donante. Como tal, los injertos pueden implantarse en el momento en que sea necesario. Es decir, no se necesita tiempo de espera para preparar los injertos. Los injertos de la invención son estables durante la refrigeración convencional y, por tanto, pueden servir como composición disponible para la venta.

Ejemplos experimentales

La invención se describe adicionalmente en detalle con referencia a los siguientes ejemplos experimentales.

Ejemplo 1: recubrimientos a base de ácido hialurónico-heparina para sustratos biológicos

En el presente documento se describe el desarrollo de un recubrimiento para estructuras biológicas descelularizadas (nativas y con tejido modificado por ingeniería) construido a partir de una primera capa de ácido hialurónico modificado con tiol (HA; también conocido como hialuronano) y una segunda capa de heparina modificada.

45 En el presente documento se describe el desarrollo de un recubrimiento para estructuras biológicas descelularizadas (nativas y con tejido modificado por ingeniería) construido a partir de una primera capa de ácido hialurónico modificado con tiol (HA; también conocido como hialuronano) y una segunda capa de heparina modificada.

Recubrimiento de HA

Se reticuló HA modificado con tiol (Glycosan, San Francisco, EE.UU.) en grupos aminos de estructuras biológicas descelularizadas (NH₂) usando los grupos sulfhidrilo (SH) en el HA. Esto se logró mediante un agente reticulante heterobifuncional constituido por éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) y maleimida, donde el NHS reacciona con los grupos amina en los vasos descelularizados y la maleimida reacciona con los grupos sulfhidrilo en el ácido hialurónico. El ácido hialurónico reticulado creó una capa continua de unos pocos micrómetros de grosor sobre la longitud del vaso tubular, "ocultando" el colágeno expuesto de los vasos descelularizados.

50 Se reticuló HA modificado con tiol (Glycosan, San Francisco, EE.UU.) en grupos aminos de estructuras biológicas descelularizadas (NH₂) usando los grupos sulfhidrilo (SH) en el HA. Esto se logró mediante un agente reticulante heterobifuncional constituido por éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) y maleimida, donde el NHS reacciona con los grupos amina en los vasos descelularizados y la maleimida reacciona con los grupos sulfhidrilo en el ácido hialurónico. El ácido hialurónico reticulado creó una capa continua de unos pocos micrómetros de grosor sobre la longitud del vaso tubular, "ocultando" el colágeno expuesto de los vasos descelularizados.

Modificación de heparina y recubrimiento de heparina modificada

La segunda etapa del recubrimiento fue la heparina aminada “en el extremo”, producida mediante aminación reductora, que se reticuló en los grupos carboxilo (COOH) del ácido hialurónico mediante EDC/NHS. La aminación de heparina “en el extremo” se logró en el átomo de carbono electrófilo de la cadena de extremo de la heparina, que bajo calor atacó el nitrógeno nucleofílico de la amina primaria de dihidrazida de ácido adípico (ADH) para producir un enlace débil estabilizado usando cianoborohidruro de sodio (NaCNBH₃). Esto produjo un grupo de amina primaria terminal en la heparina (figura 2 A superior). La heparina aminada en el extremo se limpió mediante diálisis y se reticuló en los grupos carboxilo (COOH) restantes del recubrimiento de HA mediante EDC/NHS. La heparina unida de esta manera se extendió luminalmente (debido a la hidratación) exponiendo la secuencia de pentasacárido activo de la heparina evitando la activación inmediata de la coagulación. Esta reacción se describió esquemáticamente en la figura 1.

En determinados casos, la modificación de heparina comprende una etapa adicional. La modificación de heparina puede llevarse más allá modificando la amina primaria ADH con 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo (sulfo-SMCC) (figura 2A inferior). Esta ruta usaba la ADH-amina para unir NHS dejando un grupo maleimida reactivo con sulfhidrido. La heparina modificada reaccionó espontáneamente con los grupos tiol restantes en los recubrimientos hialurónicos.

Aislamiento de aorta de rata

Se recogió la aorta ascendente de ratas Sprague Dawley bajo anestesia general (isoflorano). Brevemente, las ratas se abrieron mediante una laparotomía de la línea media y se disecó para liberar la aorta ascendente. A continuación, se aclaró la aorta con PBS frío y se sometió a descelularización en el plazo de la media hora de aislamiento.

Modificación de tejidos por ingeniería de vasos

Se crearon arterias porcinas con tejidos modificados por ingeniería sembrando cinco millones de células de músculo liso carotídeo porcino en una malla tubular de ácido poliglicólico (3 mm de diámetro y 8 mm de longitud; Concordia Medical, Coventry, RI) alrededor de un tubo de silicona y se cultivaron en un biorreactor conectado a una bomba peristáltica al 5% de CO₂ y 37°C. Los vasos modificados por ingeniería se recogieron de biorreactores después de 8 semanas de cultivo y se aclararon dos o tres veces con PBS para retirar trazas de medio de cultivo. En el plazo de media hora de aislamiento, los tejidos se sometieron a descelularización.

Procedimiento de descelularización de tanto aortas como vasos con tejido modificado por ingeniería como aortas de rata

La descelularización se logró usando un método a base de detergente que incluía incubación en tampón CHAPS/SDS (CHAPS 8 mM, NaCl 1 M y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 25 mM, SDS 1,8 mM, NaCl 1 M, en PBS) durante 24 horas, seguido de un lavado de 2 días con PBS para retirar completamente el detergente. Finalmente, se incubaron aortas y/o injertos con tejido modificado por ingeniería en PBS que contenía FBS al 10% (v/v) (Hyclone, Logan, UT) y penicilina/estreptomicina al 1% (pen/estrep). Todas las etapas de descelularización se llevaron a cabo a 37°C con agitación en condiciones estériles. Los vasos descelularizados se almacenaron en PBS que contenía pen/estrep al 1% a 4°C durante hasta 2 semanas.

Protocolo de recubrimiento

Los vasos descelularizados se montaron en una cámara de perfusión de circuito cerrado construida internamente mediante el ligamiento del extremo de los vasos en agujas tapadas. Antes de recubrir los vasos, se perfundieron con pen/estrep al 5% en disolución de PBS. El agente reticulante de SM(PEG)nNHS-PEG-maleimida (Thermo) (100 mg) equilibrado a temperatura ambiente, se disolvió en 187 µl de DMSO mediante agitación en vórtex seguido de una etapa de sonicación de 2 minutos. Cuando la disolución de agente reticulante-DMSO era transparente, se añadieron 3 ml de PBS y la disolución total se perfundió inmediatamente en el vaso mediante la llave de paso de 3 vías. La disolución de agente reticulante volvió a perfundirse dentro del vaso a través de un segundo bucle, creando una perfusión continua en forma de bucle durante 30 min. El exceso de agente reticulante se aclaró del vaso mediante perfusión de extremos abiertos de los vasos con 100 ml de PBS. El aclaramiento no se realizó durante más de 15 min ya que los grupos reactivos con tiol del agente reticulante unido reaccionaron con el agua en PBS. A continuación, se disolvió el ácido hialurónico modificado con tiol (Glycosan, San Francisco, EE.UU.) en 1 ml de agua desgasificada sin destapar el vial. El vial se colocó en una placa giratoria durante 30 minutos para que se disolviera por completo. Se perfundieron en el vaso dos mililitros del ácido hialurónico modificado con tiol reconstituido en el transcurso de 2 horas en un circuito cerrado. Después de 2 horas, se retiró el exceso de ácido hialurónico modificado con tiol mediante aspiración con jeringa insertada en la llave de paso de 3 vías. A continuación, se aclaró el vaso durante 2 horas con 500 ml de PBS en una forma de un bucle retirando el ácido hialurónico sin reaccionar pero unido.

Si se deseaba una morfología más rugosa, los vasos limpios se perfundieron con 5 ml de mezcla de hialuronidasa (300 µg/ml)/colagenasa (0,5 mg/ml) a 37°C durante 2 h. Después de la perfusión de la mezcla de hialuronidasa/colagenasa, los vasos se aclararon con 200 ml de PBS mediante perfusión de extremo abierto.

Se preparó heparina modificada con ADH-amino añadiendo heparina (100 mg, 8,3 µmol) en 10 ml de formamida y

calentando a 50°C. Después de que la heparina se disolvió totalmente (aproximadamente 30 min), se añadió dihidrazida de ácido adípico (ADH) (10 mg, 92 µmol). La reacción se mantuvo a 50°C durante 6 h. Luego se añadió cianoborohidruro de sodio acuoso (9,5 mg, 150 µmol) y la mezcla se incubó a 65°C durante 24 h adicionales. Se diluyó la mezcla de reacción con 50 ml de agua y se dializó contra 2 l de agua durante 48 h usando una membrana de diálisis de corte de peso molecular 3500 (*molecular weight cutoff*, MWCO). Se recuperó, se liofilizó y se purificó el retenido mediante precipitación con etanol. Se disolvió heparina modificada con amino (120 mg) en tampón NaCl/MES al 16% p/v a pH 7. Se disolvió EDC (110 mg) y NHS (78 mg) en 10 ml de tampón NaCl/MES al 16% p/v a pH 5 y se perfundió a través del vaso durante 15 minutos (preactivando carboxilos de colágeno). El exceso de EDC/NHS se aclaró mediante perfusión de 50 ml de tampón MES a pH 7. Entonces se perfundió heparina disuelta a través de los vasos durante 1 h. El exceso de heparina sin reaccionar se lavó mediante perfusión con 500 ml de PBS.

Características de los recubrimientos de HA y HA-heparina

La reticulación de HA en aortas descelularizadas usando los grupos amina de aortas y grupos tiol HA mediante el agente reticulante de NHS-maleimida SM(PEG)₁₂ se optimizó a una concentración de agente reticulante de SM(PEG)₁₂ 40 mM para una cobertura completa de las estructuras descelularizadas. Los grupos carboxilo accesibles a la superficie disponibles en la capa de HA para la etapa de adición de heparina se evaluaron mediante el etiquetado de nanopartículas (NP). Tal como indican las NP a una concentración de SM(PEG)₁₂ 40 mM, una gran cantidad de grupos carboxilo libres permanecen en la superficie del recubrimiento de HA.

Se recubrieron aortas abdominales tubulares de rata descelularizadas con una perfusión de circuito cerrado. Los cambios morfológicos en el lado luminal del vaso fueron obvios en las imágenes de microscopía electrónica de barrido (*scanning electron microscopy*, SEM), tal como se muestra en la figura 4. Las aortas de control descelularizadas (diámetro luminal de aproximadamente 3 mm) tienen un aspecto rugoso debido a los lavados con detergente de descelularización necesarios para la retirada celular. La reticulación de HA mediante SM(PEG)₁₂ sobre la superficie de los vasos dio como resultado una superficie de vasos lisa. La capa de heparina reticulada “en el extremo” en la parte superior de la capa de HA restauró el aspecto más rugoso del vaso.

Una sección transversal de SEM del recubrimiento de HA-heparina capa por capa de las aortas abdominales de rata descelularizadas mostró que el recubrimiento se extendía luminalmente en la aorta. Tal como se muestra en la figura 5, el recubrimiento se observó como una estructura alisada que recubre el vaso poroso.

Los análisis histológicos de las secciones transversales de vasos recubiertos capa por capa se realizaron con azul de toluidina, azul de alciano y azul alciano/PAS. El azul de toluidina es un tinte básico atraído por estructuras cargadas negativamente tales como heparina. Los colorantes catiónicos azul alciano y azul alciano/PAS también son atraídos por estructuras cargadas negativamente en condiciones alcalinas. Tal como se muestra en la figura 6, los tres tintes tiñeron fuertemente el recubrimiento de HA-heparina.

Para evaluar los efectos trombogénicos de los recubrimientos, se incubaron plaquetas de sangre aisladas con agitación constante en la superficie de vasos descelularizados, recubiertos con HA y recubiertos con HA-heparina. Tal como muestran las imágenes de SEM en la figura 7 y 8, las plaquetas se adhirieron fuertemente a los vasos descelularizados no recubiertos y la superficie de los vasos descelularizados no recubiertos estaba densamente cubierta de plaquetas y glóbulos rojos. Los vasos descelularizados contienen abundante colágeno en la superficie, que es un potente activador de plaquetas, por lo que los vasos descelularizados no recubiertos son trombogénicos. En comparación, los vasos recubiertos con HA y HA-heparina resistieron fuertemente la adhesión de las plaquetas. De hecho, fue difícil encontrar plaquetas en la superficie de los vasos recubiertos.

Para evaluar la cantidad de heparina funcional inmovilizada en la capa de HA, se utilizó el ensayo del factor X. Fue un método basado en el cambio conformacional de la antitrombina III por la heparina bioactiva, lo que dio como resultado la inhibición del factor Xa. A continuación, se midió la inhibición del factor X mediante el sustrato cromogénico S-2732 (Suc-Ile-Glu (g-Pip)-Gly-Arg-pNA), y se evaluó la heparina funcional en comparación con los patrones de heparina (0-100 ng) hecha reaccionar de la misma manera que los amazones. La capacidad de una superficie para inactivar el factor X se correlacionó fuertemente con la capacidad de la superficie para retrasar la cascada de la coagulación sanguínea. En comparación con la aorta nativa recién extirpada revestida por células endoteliales funcionales para retardar la coagulación, las aortas descelularizadas revestidas de HA-heparina mostraron al menos tanta heparina activa, que inhibe la actividad del factor X (figura 9). Las aortas de control descelularizadas fueron altamente trombogénicas y no demostraron ninguna actividad de heparina, como lo demuestra la muy baja inactivación del factor X (véase la figura 9). Una monocapa continua de células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) cultivadas durante 5 días que se sabía que demostraba actividad anticoagulante demostró una menor actividad anti-factor X que los recubrimientos de HA-heparina.

Para evaluar la toxicidad potencial de estos recubrimientos, se sembraron células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) aisladas del cordón umbilical humano en las aortas recubiertas capa por capa de HA-heparina y se cultivaron durante 2 semanas. Las HUVEC proliferaron sobre la superficie del recubrimiento, pero también invadieron el recubrimiento degradándolo en el transcurso de las dos semanas. La invasión descendente de las HUVEC en el recubrimiento pudo verse en la imagen de microscopía confocal (figura 10), donde se mostraban las

HUVEC que migraban hacia adentro sobre un apilamiento z de 10 μm .

También se realizaron experimentos para examinar si los recubrimientos producen respuestas inflamatorias, estimulan el reclutamiento de monocitos y macrófagos, o estimular la adhesión e invasión de leucocitos. Además, se realizaron experimentos para determinar si los injertos recubiertos con estos recubrimientos se recubrieron luminalmente con células endoteliales del huésped después del implante en el sistema vascular. Además, se llevaron a cabo experimentos para determinar si la capa de HA o la capa de heparina se unían a factores de crecimiento que conducían a la repoblación celular de los injertos. Finalmente, se realizaron experimentos para determinar si los recubrimientos eran resistentes a la hiperplasia de la íntima, un modo común de fallo a medio plazo o a largo plazo para los injertos arteriales.

Los datos descritos en el presente documento demostraron que los recubrimientos de HA y HA-heparina sirvieron como recubrimientos antitrombogénicos para armazones biológicos que incluyen injertos vasculares descelularizados. El recubrimiento descrito en el presente documento utilizó la reticulación de HA con sustratos proteicos del tejido descelularizado. Además, el recubrimiento capa por capa de heparina sobre HA mejoró las propiedades anticoagulantes inmediatas. La capa de HA ofrecía una barrera física al colágeno trombogénico, otras proteínas de la matriz extracelular o materiales sintéticos que estimulaban la cascada de la coagulación extrínseca o intrínseca, mientras que la capa de heparina activa estaba unida en su conformación activa con una secuencia de pentasacárido expuesta libre para interactuar con componentes de la sangre.

Se demostró que el recubrimiento con HA solo inhibía la coagulación, tal como lo demuestra la atenuación de la adhesión/activación plaquetaria y la inactivación del factor X y la actividad de la trombina. Por tanto, los recubrimientos de HA pueden ser eficaces para injertos de pequeño calibre (es decir, de menos de o igual a 6 mm de diámetro). Además, los injertos recubiertos con HA mostraron propiedades mecánicas más elevadas, medidas por el aumento de la resistencia de la sutura conferida por las características mecánicas del recubrimiento. Los datos también demostraron que los recubrimientos de HA y los recubrimientos de capa por capa de HA-heparina eran muy propicios para el crecimiento celular. Por tanto, tal como se presenta en el presente documento, los recubrimientos de HA y los recubrimientos de HA-heparina capa por capa sirvieron como recubrimientos antitrombóticos funcionales de injertos vasculares.

Con el fin de caracterizar más completamente el proceso de formación de gel en la superficie de los injertos que contienen colágeno, se evaluó el tiempo de gelificación del agente reticulante de PEG y el ácido hialurónico (HA) a 25°C mediante un reómetro de cepa controlada (ARES LSI, TA Instruments, New Castle, DE). Se montó una aorta porcina descelularizada sobre el cono de titanio del aparato, seguido de la incubación de 400 μl de agente reticulante de PEG durante 45 minutos. Después de esto, se aspiró el agente reticulante de PEG y se cargaron 1000 μl de HA en la parte superior de la aorta porcina descelularizada (estas etapas imitaban el recubrimiento perfundido 3D). Finalmente, el complejo de gel de aorta porcina descelularizada-HA se cerró con la placa de acero inoxidable del aparato (25 mm de diámetro, ángulo de 0,04 radianes, espacio de 45 μm). Como control, los geles de HA se depositaron sobre aorta porcina descelularizada sin la adición de la etapa de agente reticulante de PEG, y el sistema se cerró con la placa de acero inoxidable de la misma manera. Los módulos de elasticidad (G') y de pérdida (G'') (1% de deformación, 1 Hz) se registraron cada 9 s durante 24 h. El módulo de cizalladura complejo (módulo de almacenamiento) G de los geles de HA-PEG y los geles de HA solos se calculó a partir de:

$$G = \frac{Td}{2I_p\gamma}$$

donde T era la respuesta de torsión, d era el diámetro de la muestra, γ era la deformación por cizalladura sinusoidal e I_p era el momento polar de inercia del cilindro ($I_p = \pi d^4/32$).

Tal como puede observarse en la figura 11, la respuesta reológica a la tensión de corte oscilatoria impuesta de los geles de HA en la aorta descelularizada en ausencia del agente reticulante fue una respuesta inicial similar a un líquido que polimerizó hasta el 80% del volumen añadido después de 23 horas. Esto se mostró en el panel A y las 23 horas se indicaron mediante la línea punteada roja que cruza el eje x del tiempo logarítmico en 5×10^4 s. Cuando se transforma el marco de tiempo desde una escala logarítmica a una escala Ln (escala Ln representada gráficamente en el panel B), la polimerización del componente HA solo en el injerto descelularizado dio como resultado el mismo marco de tiempo de 23 horas para ganar un 80% de polimerización.

La adición del agente reticulante de PEG en la aorta descelularizada activando los grupos amina antes de la adición del componente HA indujo una polimerización del 80% de la capa de HA en el plazo de 4 horas de incubación. Esto fue evidente en ambos paneles C y D, donde en los gráficos de tiempo log y Ln (respectivamente) del módulo de almacenamiento (G') con respecto al tiempo se vuelve constante en el panel C 10^4 s (escala logarítmica). La adición del agente reticulante de PEG en la aorta descelularizada activando los grupos amina antes de la adición del componente HA indujo una polimerización del 80% de la capa de HA en el plazo de 4 horas de incubación. La ausencia de cambios de gran magnitud en las propiedades viscosas (G'') y elásticas (G') después de 4 horas no es indicativa de ningún cambio microestructural adicional en el componente de gel de HA, lo que indica que el HA precedido por PEG alcanza su forma "madura" en el plazo de 4 horas. La polimerización del 80% en todos los casos

se estimó aproximadamente como el lugar donde no fueron evidentes más cambios microestructurales a partir de la constancia en el módulo de almacenamiento con respecto al tiempo. Esto se identificó en todos los paneles con una línea punteada roja.

- 5 La caracterización reológica descrita de ese modo establece el tiempo de perfusión del componente de HA sobre los vasos descelularizados para crear el recubrimiento a un tiempo de perfusión mínimo de 4 horas a un tiempo de perfusión máximo de 18 horas.

10 Para evaluar la estabilidad de los recubrimientos, la aorta porcina y de rata, así como los injertos vasculares con tejido modificado por ingeniería, se descelularizaron y recubrieron tanto con ácido hialurónico (HA) solo como ácido hialurónico/heparina (HA/HP). El ejemplo que se muestra en este caso fue de aortas abdominales descelularizadas de rata, pero las diversas estructuras de vasculatura estudiadas se comportaron de manera similar.

15 La estabilidad de los recubrimientos de HA y HA/HP se evaluó a 37°C durante dos semanas incubando los vasos descelularizados recubiertos en las siguientes condiciones: 1) PBS; 2) medio de cultivo celular M199; y 3) plasma de sangre de rata recién aislado obtenido filtrando sangre de rata recién extraída a través de filtros de jeringa de 0,2 µm. Tras las incubaciones descritas anteriormente, se evaluó el recubrimiento eluido cuantificando la cantidad total de polisacáridos en disolución en los días 1, 3, 7 y 14 usando el ensayo de carbazol. El ensayo de carbazol cuantifica los polisacáridos en disolución basándose en cambios colorimétricos con un límite de detección de 2 µg/ml.

20 La cantidad de HA y HA/HP liberados de las diversas superficies descelularizadas recubiertas fue comparable a la cantidad de polisacáridos liberados de los vasos descelularizados sin recubrir (muestras de control negativo estable). Por ejemplo, la mayor cantidad de polisacáridos liberados detectados de las superficies revestidas fue de 0,2 µg/ml, que era la cantidad de polisacáridos liberados por el vaso descelularizado no recubierto usado como control negativo y también estaba por debajo del límite de detección del ensayo de carbazol. Los pocos polisacáridos liberados en disolución a lo largo del tiempo indicaron una alta estabilidad del recubrimiento en condiciones fisiológicas *in vitro*.

25 Tras el tiempo de incubación de dos semanas, los injertos descelularizados recubiertos se evaluaron histológicamente para determinar el recubrimiento restante en los vasos descelularizados usando colorantes azul de toluidina y azul alicano/PAS. Tal como se muestra en la figura 12, tras la incubación con PBS a 37°C durante dos semanas, las aortas de rata descelularizadas recubiertas con ácido hialurónico/heparina mantuvieron una capa continua del recubrimiento en su lugar. Esto fue especialmente evidente en comparación con las aortas de rata descelularizadas sin recubrimiento (control) donde solo estaba presente la tinción de fondo de la aorta descelularizada. Además, después de dos semanas de incubación con plasma sanguíneo de rata recién extraído (cambiado cada tres días), la capa de recubrimiento de ácido hialurónico/heparina también permaneció visible en las aortas de rata descelularizadas tal como se observa en las tinciones con azul de toluidina y azul alicano/PAS. Esta observación sugirió que las enzimas sanguíneas no degradaron el recubrimiento en su entidad en dos semanas.

35 Se evaluó la respuesta de crecimiento de las células endoteliales en las capas de recubrimiento individuales. Se recubrieron una capa de agente reticulante de PEG sola, una capa de agente reticulante de PEG y ácido hialurónico y, por último, los componentes de agente reticulante de PEG-ácido hialurónico-heparina combinados. Después de la gelificación, cada uno de estos sistemas se sembró con células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) recién aisladas y se cultivó durante tres días. La figura 13 muestra las HUVEC cultivadas del día 3 que se tiñeron con DAPI para los núcleos (figura 13) y VE-cadherina para un marcador de superficie de la membrana endotelial (figura 13). Se vio que las diversas capas del recubrimiento apoyaban la adhesión y proliferación de células endoteliales *in vitro*. Determinadas áreas del recubrimiento tenían una cobertura celular menos densa que otras áreas, ya que la cobertura celular no era uniforme en todo el recubrimiento.

45 Se recogieron y descelularizaron las aortas de rata de la porción torácica y abdominal. Las aortas de rata descelularizadas se implantaron en tres ratas sin modificaciones adicionales (grupo de control) y se recubrieron con ácido hialurónico tres aortas de rata descelularizadas antes del implante, usando las etapas de aplicar el agente reticulante de PEG seguido de HA tiolado para formar un gel en la superficie luminal de las aortas descelularizadas. El implante de la rata se realizó pinzando en primer lugar las porciones proximal y distal de la aorta infrarrenal y extrayendo un segmento de aorta de 17 mm que fue reemplazado por aorta de rata descelularizada sin tratar (grupo de control) o aorta de rata descelularizada recubierta con ácido hialurónico. Los injertos se insertaron mediante anastomosis de extremo a extremo usando suturas de nailon de monofilamento 9-0 interrumpidas. Tras suturar los injertos en su lugar, se retiraron lentamente las pinzas vasculares distales y luego las proximales y se restableció el flujo a través del injerto. La permeabilidad del injerto se controló mediante imágenes Doppler en color y ondas de pulso registradas con una sonda sectorial de 12 MHz y un aparato de ecografía a las 2 y 4 semanas. Se midieron el diámetro del injerto y la velocidad del flujo sanguíneo. Se comprobaron cuidadosamente los signos de trombosis y formación de aneurismas. Las ratas se sacrificaron después de cuatro semanas y los injertos se evaluaron histológicamente tiñendo segmentos de los injertos usando hematoxilina y eosina (H&E) para evaluación general.

Los injertos descelularizados sin recubrimiento (grupos de control) mostrados en el panel superior de la figura 14 formaron grandes coágulos con grandes cantidades de depósito de fibrina que ocluían casi por completo el flujo

sanguíneo de la aorta abdominal. La tinción con H&E mostraba el gran coágulo de sangre fibrinizado que cubría casi toda la abertura luminal del injerto implantado. El registro de ecografía Doppler del flujo sanguíneo a las cuatro semanas posteriores al implante no mostraba registro del flujo sanguíneo. En algunas ratas hubo una ausencia total de flujo sanguíneo y en otras hubo un flujo sanguíneo mínimo de aproximadamente 3 cm/s. Por otro lado, la aorta de rata descelularizada recubierta con ácido hialurónico demostró ausencia de coágulos de sangre en la mayoría de las ratas, tal como se muestra en la sección transversal teñida con H&E del panel inferior en la figura 13. Algunas ratas mostraron depósitos de coágulos de tamaño pequeño a mediano y algo de oclusión de la aorta implantada. El recubrimiento de ácido hialurónico era visible en los explantes en algunas áreas de la luz (mostrado en el panel inferior de la figura 14) pero el grosor del recubrimiento se redujo considerablemente. Las aortas de rata descelularizadas recubiertas con ácido hialurónico demostraron un flujo sanguíneo normal en el momento del explante de 4 semanas, tal como se muestra en el panel inferior de la figura 15. Los explantes no estaban dilatados y se parecían en aspecto a antes del implante. En la mayoría de las áreas, los implantes se integraron abluminalmente dentro de los tejidos circundantes. La tinción de células T y marcadores de macrófagos no ha revelado signos concluyentes de reacciones inflamatorias en los implantes.

Las aortas vasculares de rata descelularizadas recubiertas con ácido hialurónico implantadas en el modelo animal de rata sugirieron la viabilidad clínica de los injertos vasculares recubiertos con ácido hialurónico.

Se cultivaron injertos vasculares con tejido modificado por ingeniería (TEVG) según los protocolos establecidos comenzando con células de músculo liso recogidas en perros. Los injertos tenían 4 mm de diámetro y aproximadamente 5 cm de longitud. Los TEVG se descelularizaron tal como se describió previamente en la patente. En el grupo de control, los TEVG descelularizados se implantaron sin modificaciones adicionales; y el segundo grupo de animales recibió ácido hialurónico y TEVG descelularizados recubiertos con heparina. El estudio con perros usó injertos más largos que el estudio con animales de rata (los injertos implantados tenían aproximadamente 5 cm de longitud), y el sitio del implante de la arteria carótida se eligió como un modelo animal más agresivo que la aorta abdominal de la rata.

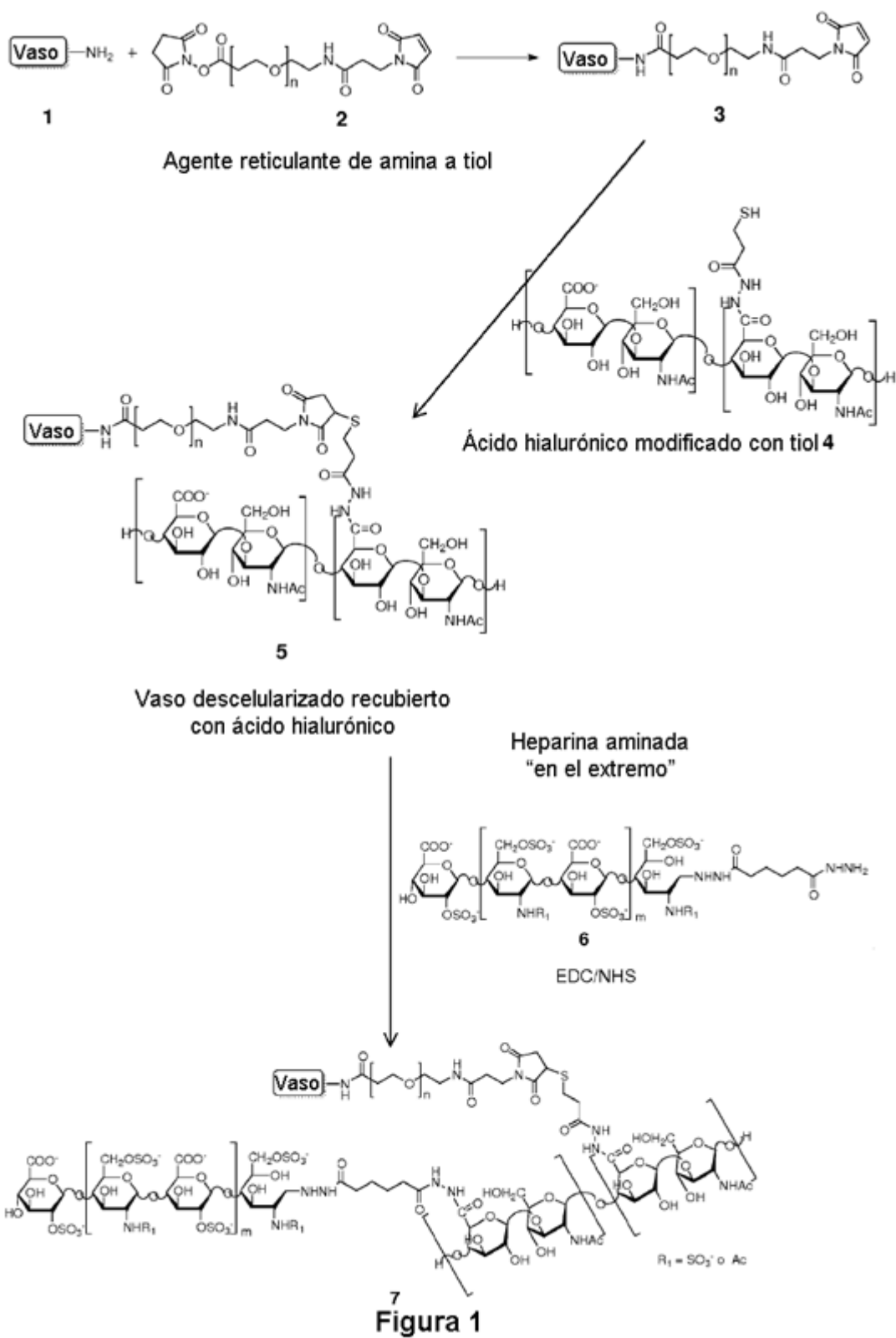
La cirugía de implante se realizó identificando y disecando en primer lugar las arterias carótidas de perro libres del tejido circundante. Se extrajo un centímetro de la arteria carótida y se implantó un TEVG descelularizado recubierto con heparina y ácido hialurónico (diámetro interior de 4 mm) en la arteria carótida derecha usando anastomosis de extremo a lado. Los TEVG descelularizados sin recubrimiento (diámetro interior de 4 mm) se implantó en la arteria carótida izquierda mediante el mismo procedimiento. El diámetro interior de los injertos vasculares coincidía estrechamente con las arterias carótidas receptoras. La permeabilidad de todos los injertos vasculares se comprobó mediante ecografía Doppler inmediatamente después del implante. Los implantes se mantuvieron en los perros durante cuatro semanas, momento en el que se explantaron y se examinaron histológicamente.

De manera similar al modelo animal de rata, los TEVG descelularizados sin recubrimiento (grupo de control) mostrado en el panel superior de la figura 16 formaron grandes coágulos de sangre con grandes cantidades de deposición de fibrina y se ocluyeron casi por completo. La tinción con H&E de la figura 15 mostró el gran coágulo de sangre fibrinizado que cubría casi toda la abertura luminal del injerto implantado. Los TEVG descelularizados recubiertos con ácido hialurónico-heparina mostraron resultados variables, con algunas áreas mostrando ausencia total de coágulos de sangre y otras áreas mostrando alguna formación de coágulos de sangre, pero significativamente menos que los injertos de control. Se encontraron células endoteliales en la superficie luminal de los TEVG recubiertos con hialurónico tal como se identifica en la figura 16.

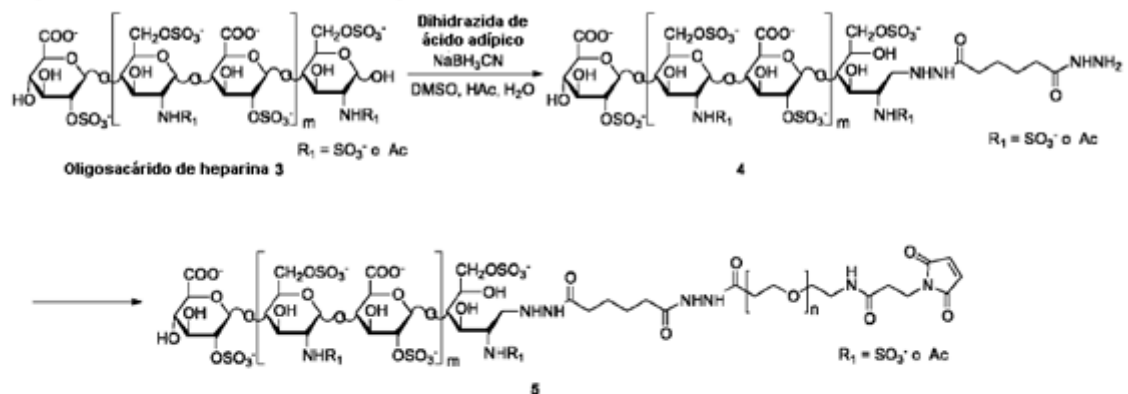
Los TEVG descelularizados recubiertos con ácido hialurónico implantados en el modelo animal de arteria carótida de perro fue un modelo desafiante que sugiere aún más la viabilidad clínica de los injertos vasculares recubiertos con ácido hialurónico.

REIVINDICACIONES

1. Composición de injerto vascular que comprende un sustrato que tiene al menos una superficie recubierta con un recubrimiento antitrombogénico que comprende una primera capa que comprende un hidrogel y una segunda capa que comprende un anticoagulante,
5 en la que la primera capa entra en contacto con la superficie luminal del sustrato y la primera capa está recubierta por la segunda capa, en la que el hidrogel comprende ácido hialurónico, y
en la que el ácido hialurónico es ácido hialurónico modificado con tiol, y
en la que el sustrato es un tejido descelularizado.
2. Composición según la reivindicación 1, en la que la primera capa se reticula con la al menos una superficie del sustrato.
10
3. Composición según la reivindicación 1, en la que la segunda capa se reticula con la primera capa.
4. Composición según la reivindicación 3, en la que la segunda capa comprende heparina.
5. Composición según la reivindicación 1, en la que el tejido descelularizado es un vaso sanguíneo descelularizado que tiene una superficie luminal, y en la que el recubrimiento antitrombogénico se recubre sobre la superficie luminal del vaso sanguíneo descelularizado.
15
6. Método de preparación de un injerto vascular recubierto con un recubrimiento antitrombogénico, que comprende las etapas de
proporcionar un sustrato que tiene al menos una superficie en el que el sustrato es tejido descelularizado, o vaso sanguíneo descelularizado; y
20 recubrir la al menos una superficie con un recubrimiento antitrombogénico, en el que dicha etapa de recubrir comprende:
aplicar una primera disolución de reticulación a la superficie;
aplicar una disolución de hidrogel a la superficie, proporcionando de ese modo una primera capa sobre la superficie del sustrato; y
25 aplicar una segunda disolución de reticulación a la primera capa y aplicar una disolución anticoagulante a la primera capa, proporcionando de ese modo una segunda capa encima de la primera capa,
en el que el hidrogel comprende ácido hialurónico y
en el que el ácido hialurónico es ácido hialurónico modificado con tiol.
7. Método según la reivindicación 6, en el que la disolución anticoagulante comprende heparina.
8. Injerto producido según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, para su uso en el tratamiento de un vaso sanguíneo enfermo en un sujeto, que comprende sortear el vaso sanguíneo enfermo implantando en el sujeto un injerto vascular antitrombogénico.
30
9. Injerto producido según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, para su uso en la proporción de acceso vascular en un sujeto, que comprende implantar en el sujeto un injerto vascular antitrombogénico.
10. Injerto según la reivindicación 9, para su uso en un sujeto que se somete o se prevé que se someta a hemodiálisis.
35



A) Esquema de modificación de heparina



B) Análisis por RMN de heparina modificada

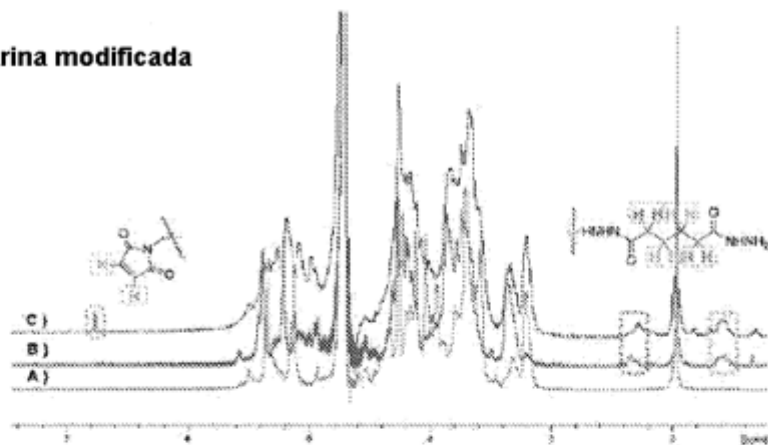


Figura 2

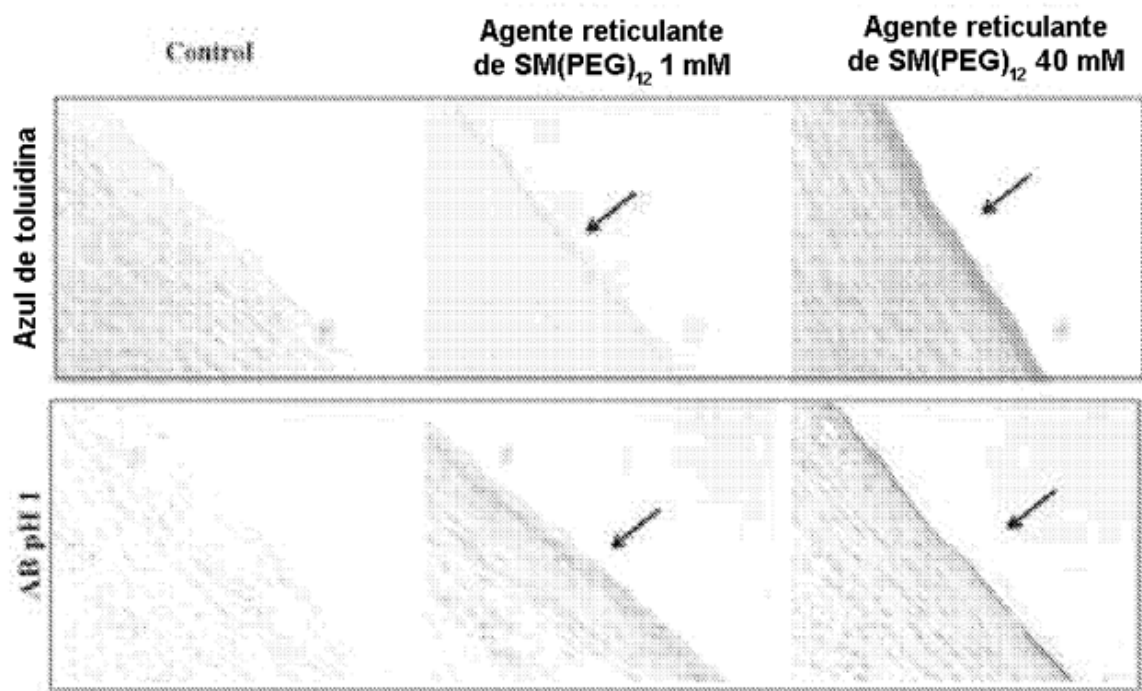


Figura 3

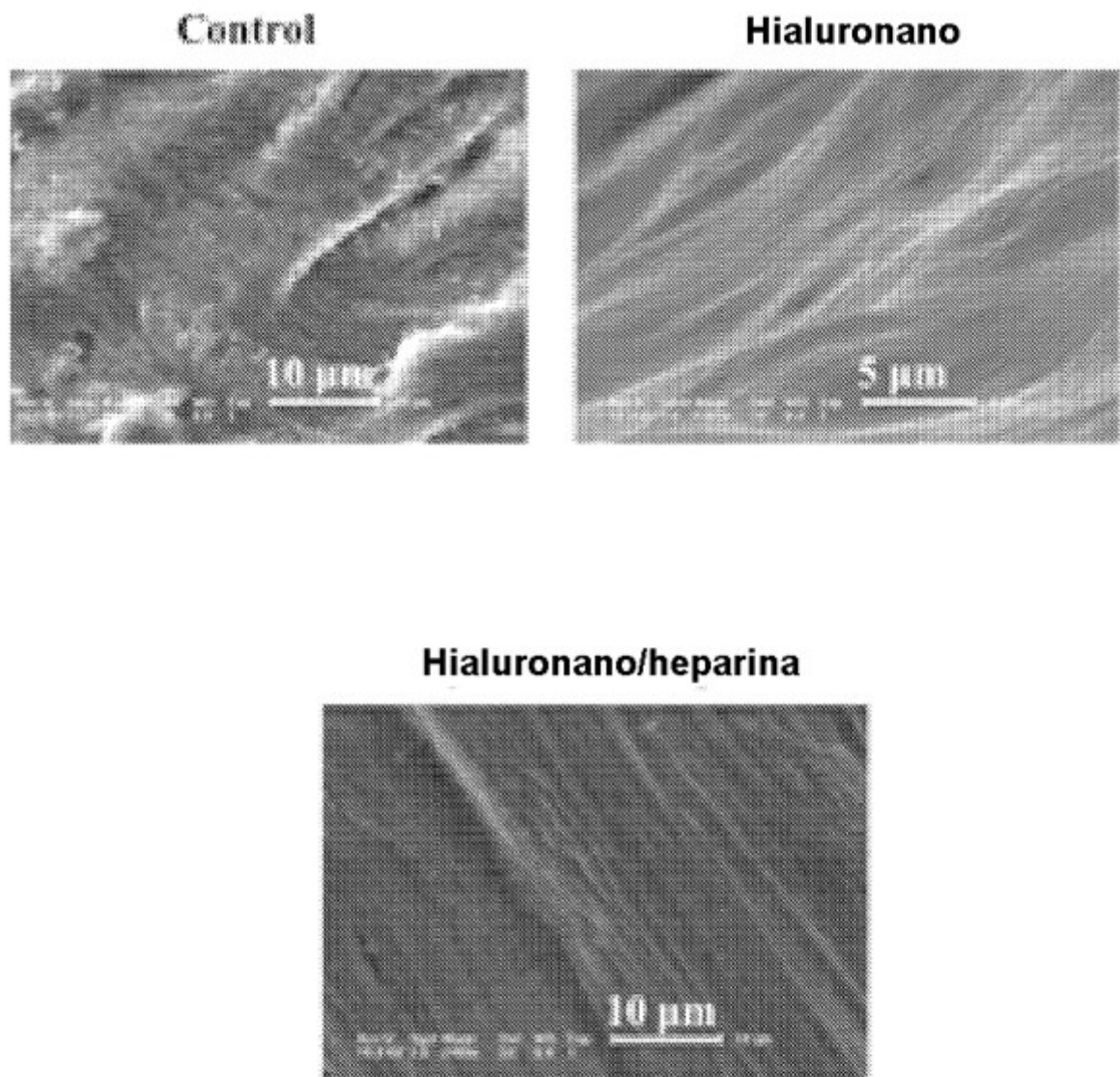


Figura 4

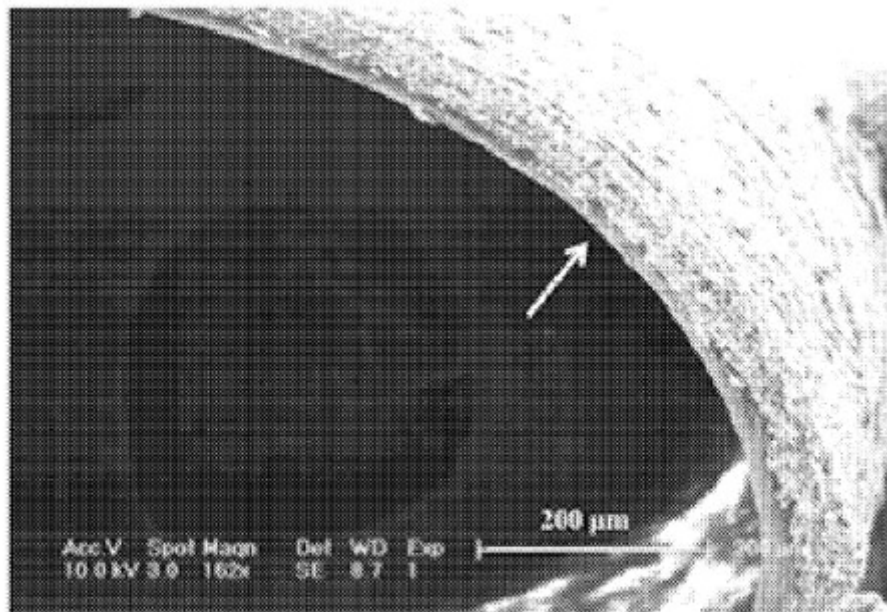


Figura 5

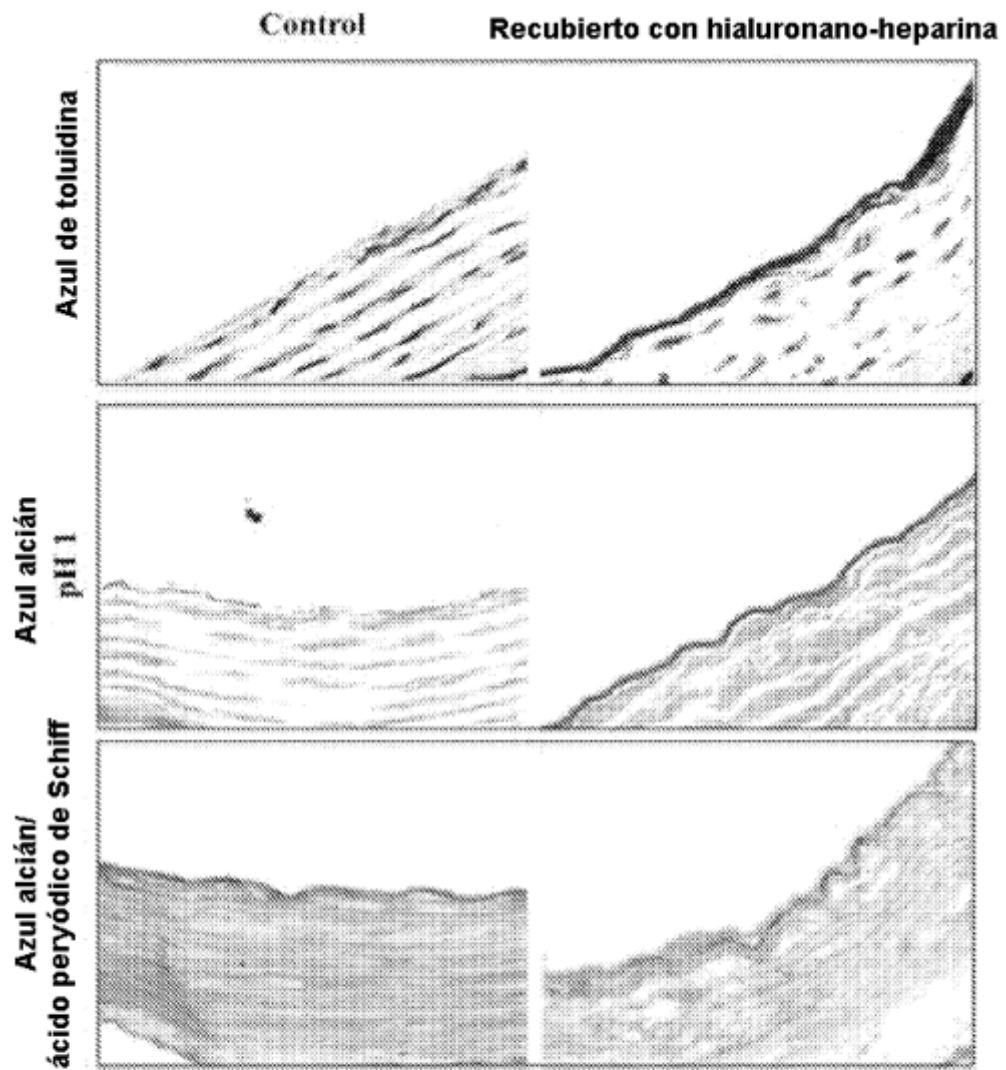


Figura 6

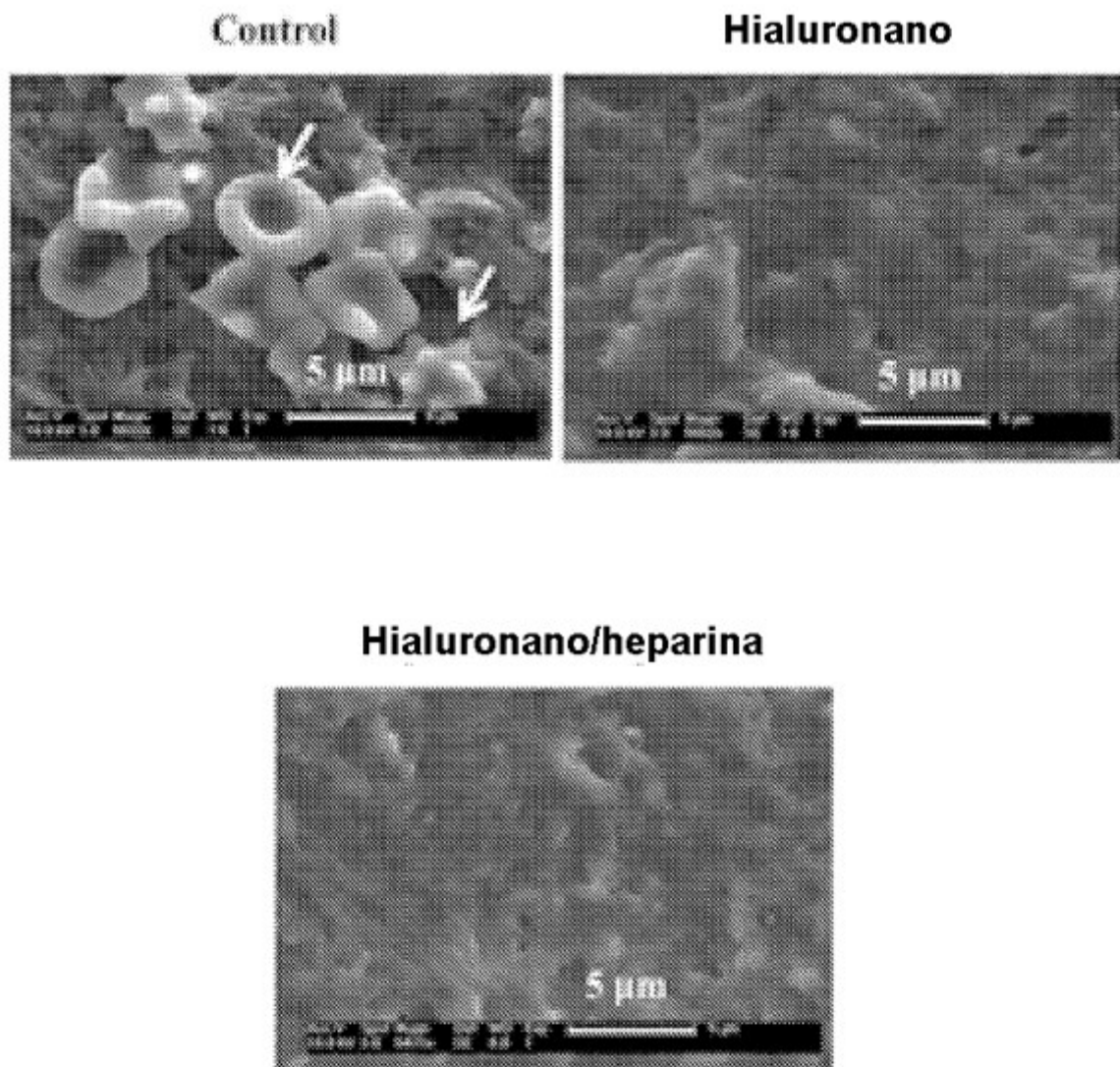
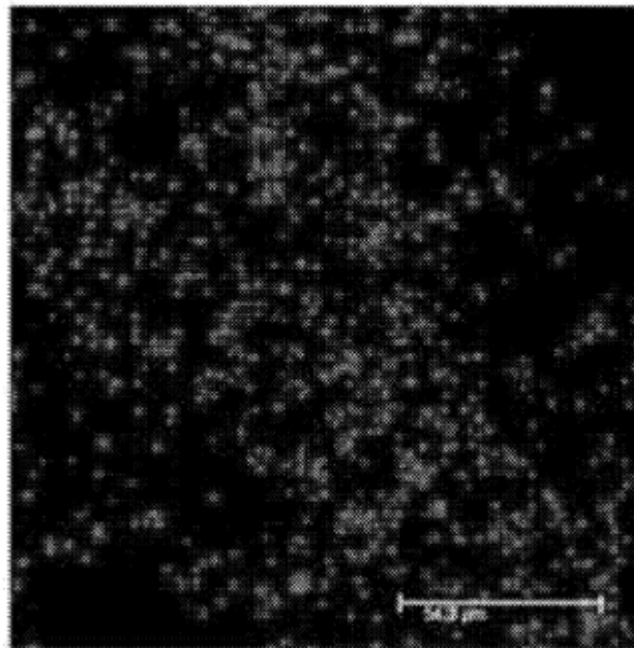


Figura 7

Control descelularizado



Recubierto con hialuronano-heparina

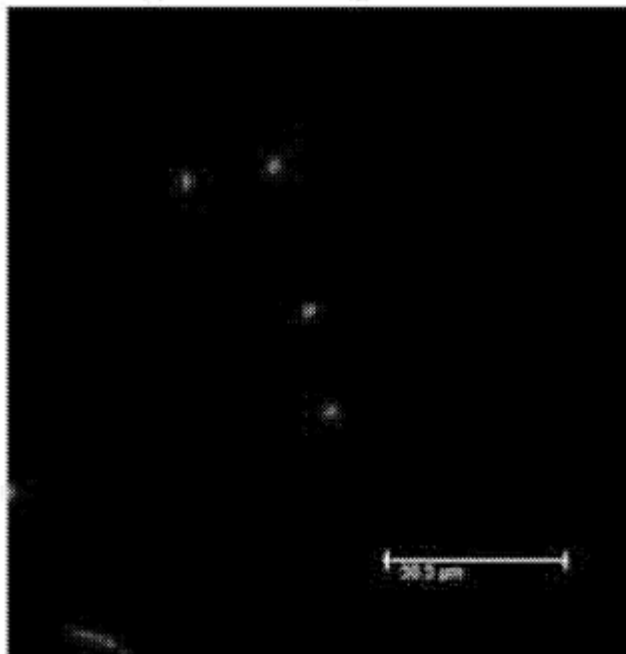


Figura 8

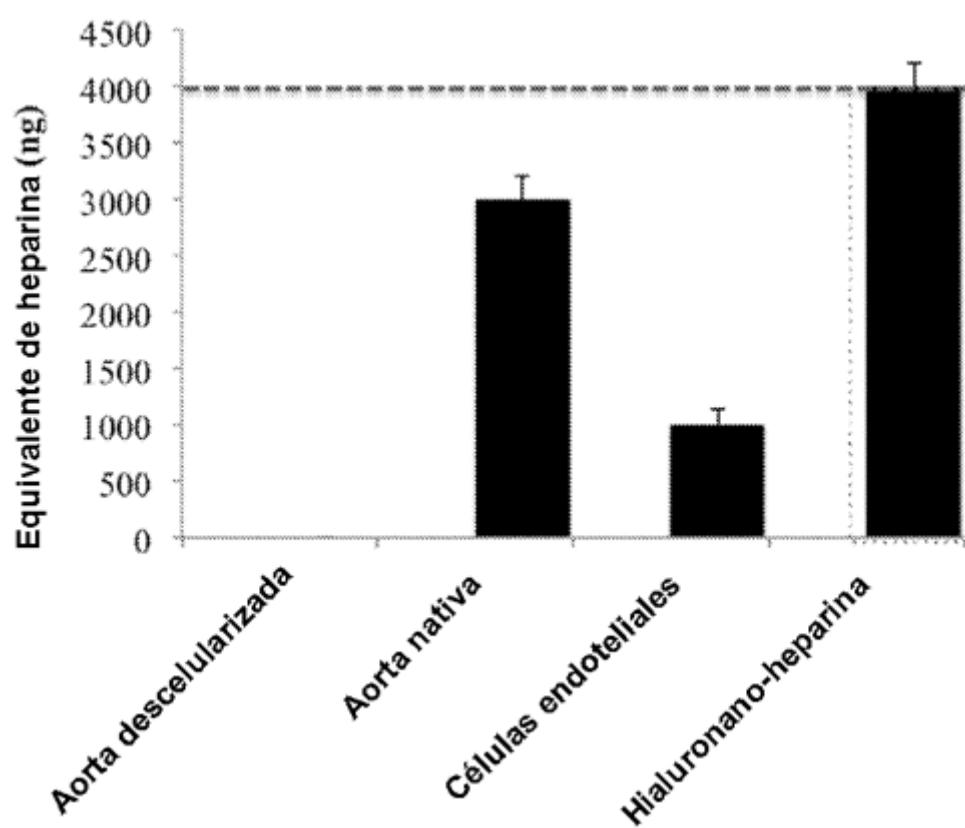


Figura 9

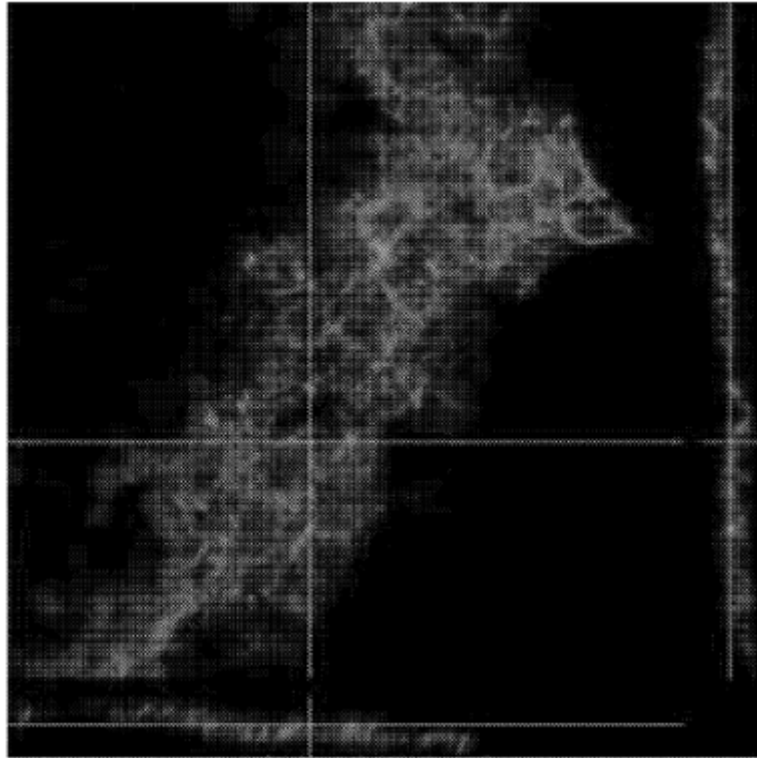


Figura 10

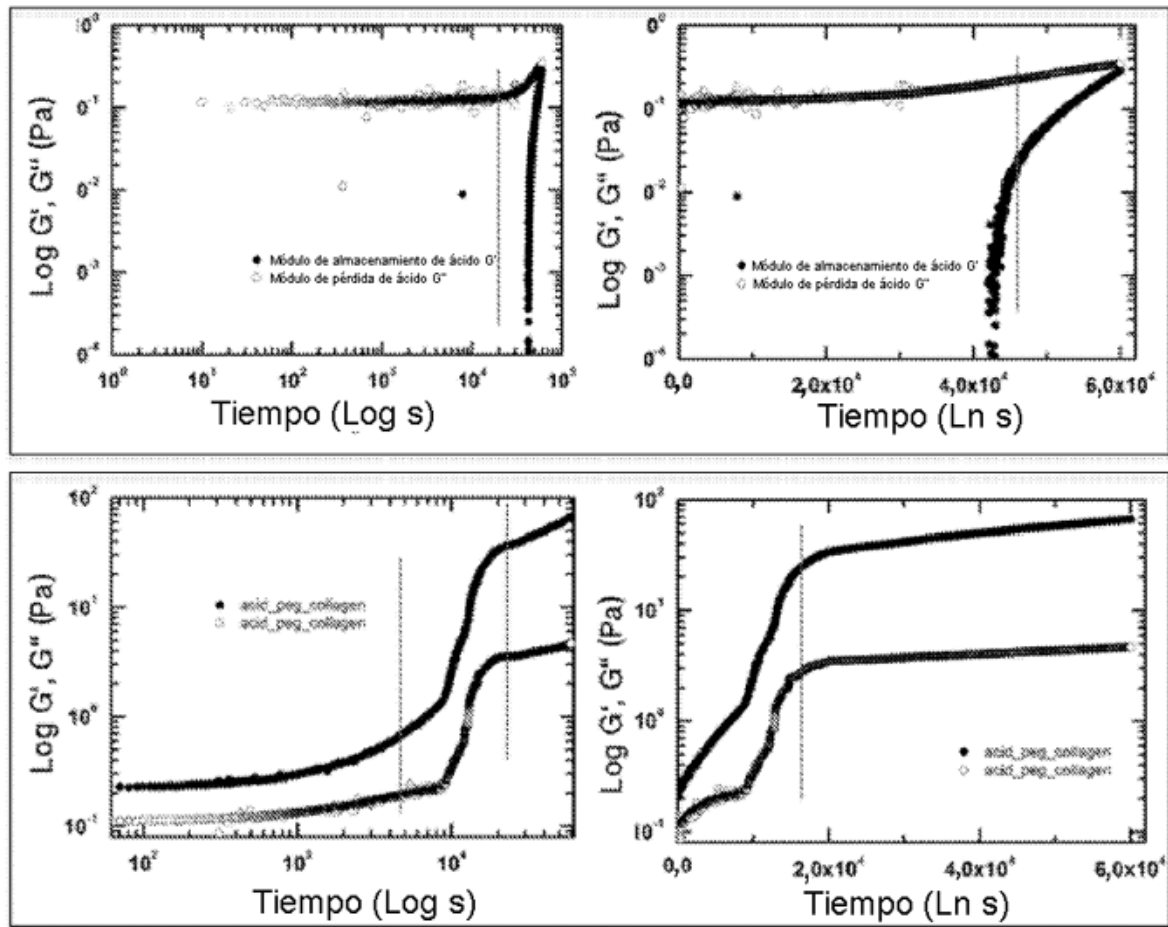


Figura 11

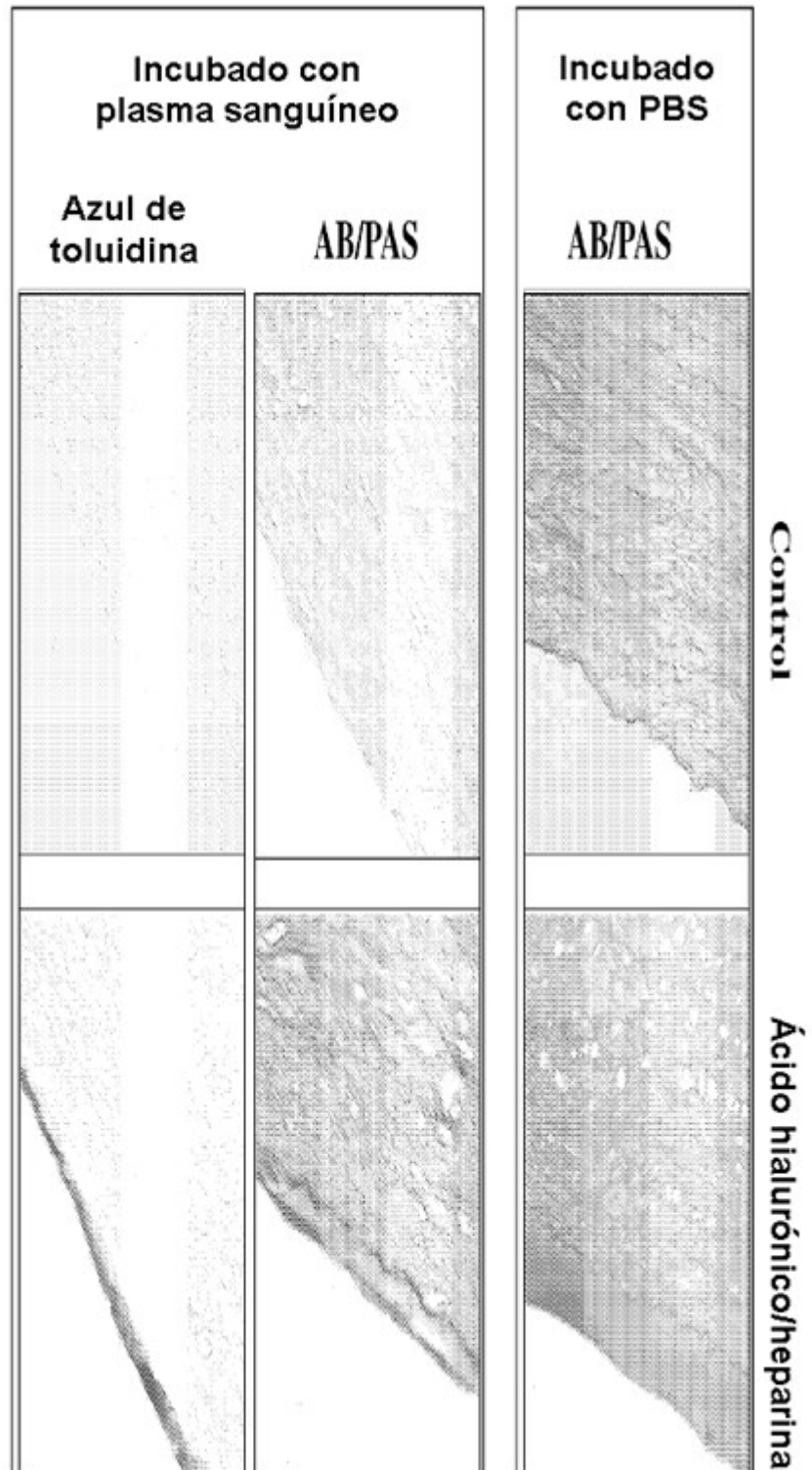


Figura 12

Activación de superficie-Agente reticulante de PEG

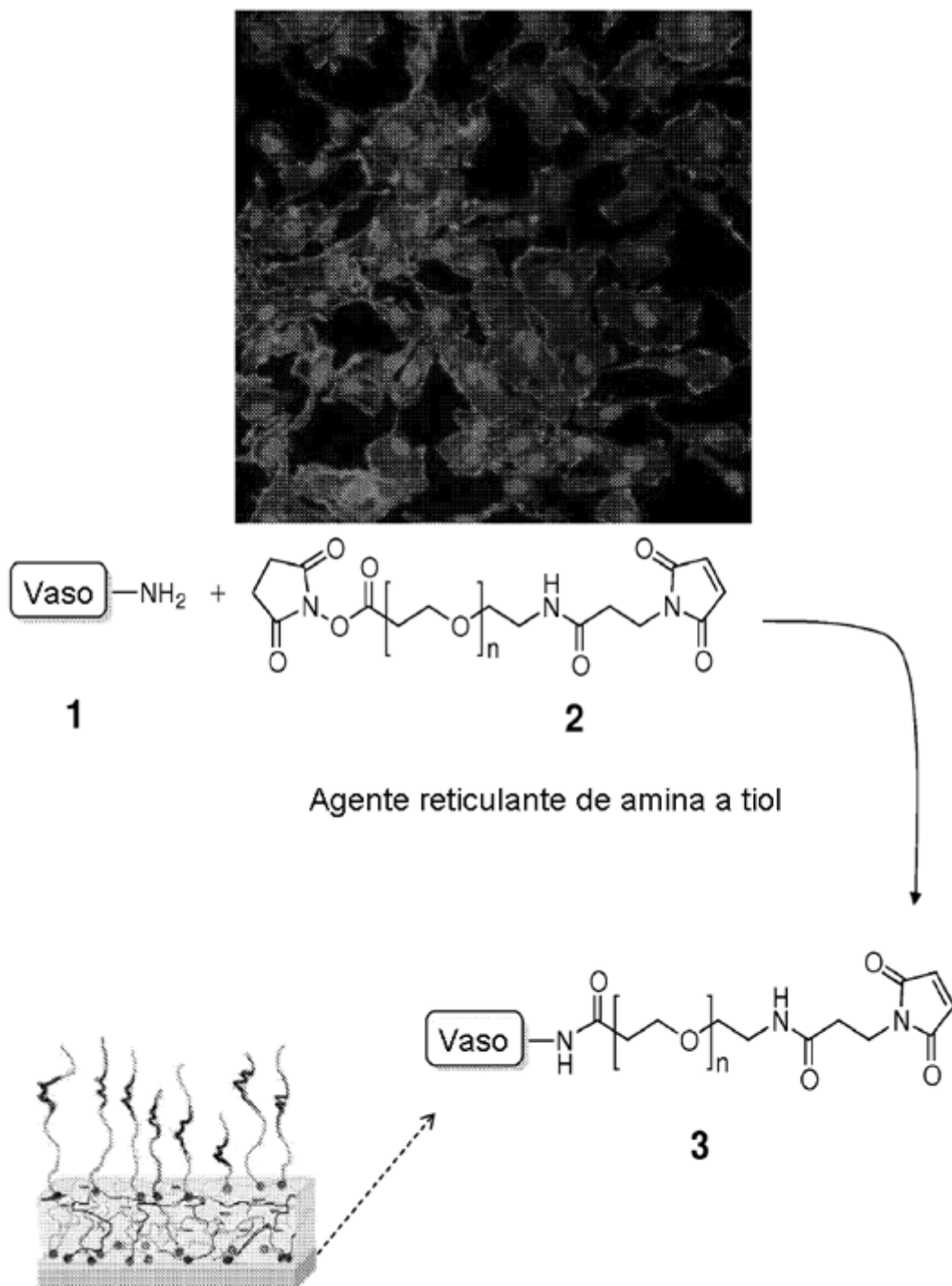
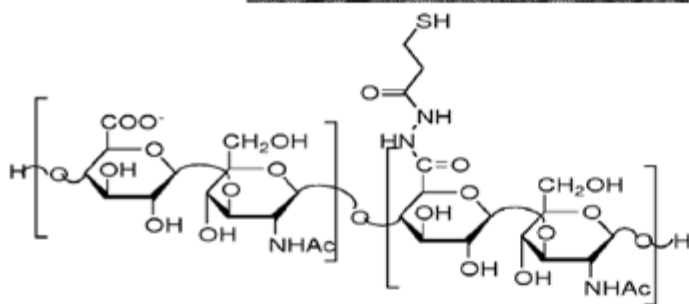
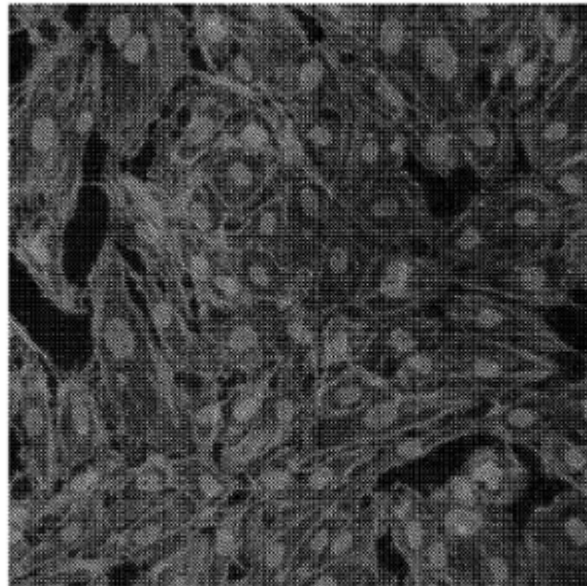
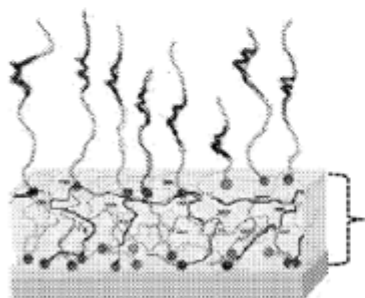
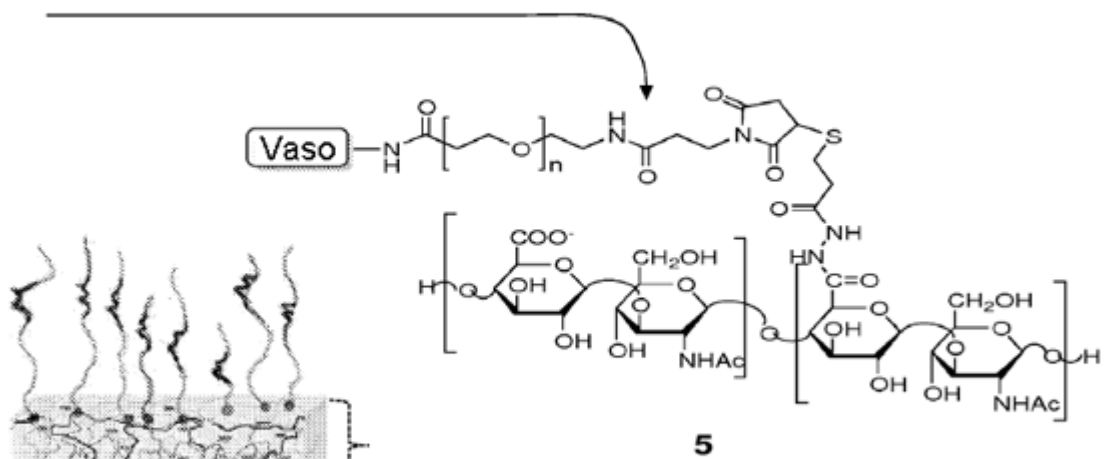


Figura 13

Capa 1-Ácido hialurónico



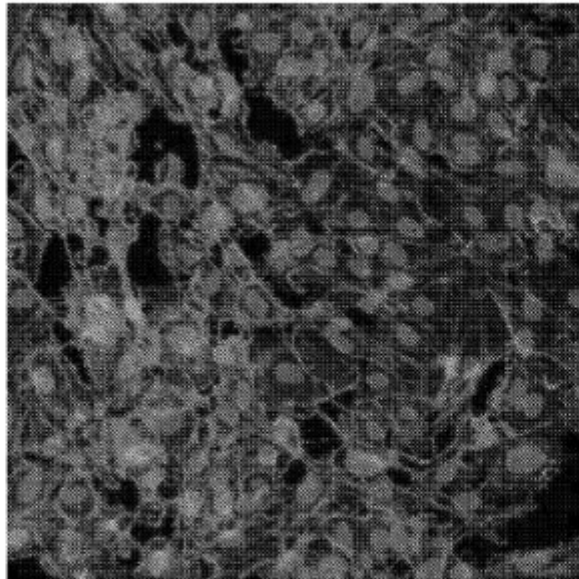
Ácido hialurónico modificado con tiol 4



Vaso descelularizado recubierto con ácido hialurónico

Figura 13

Capa 2-Ácido hialurónico y heparina



Heparina aminada
"en el extremo"

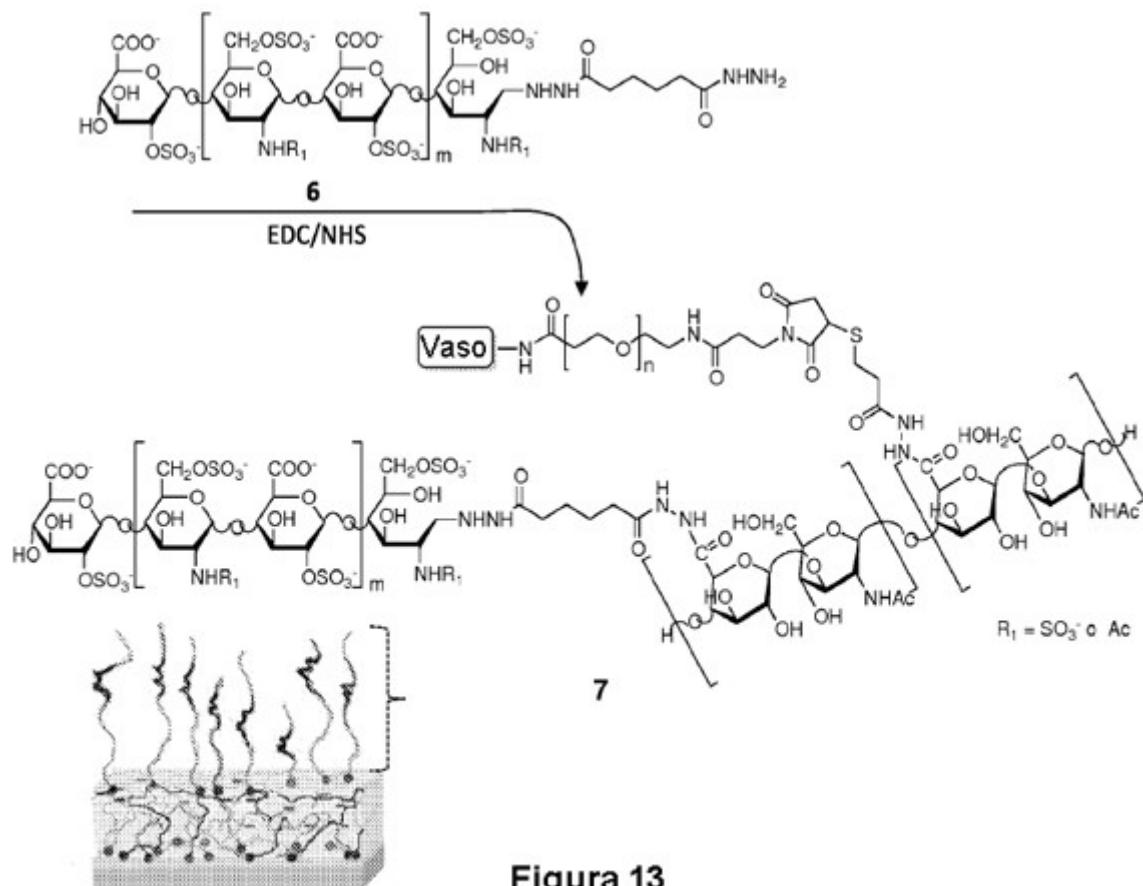


Figura 13

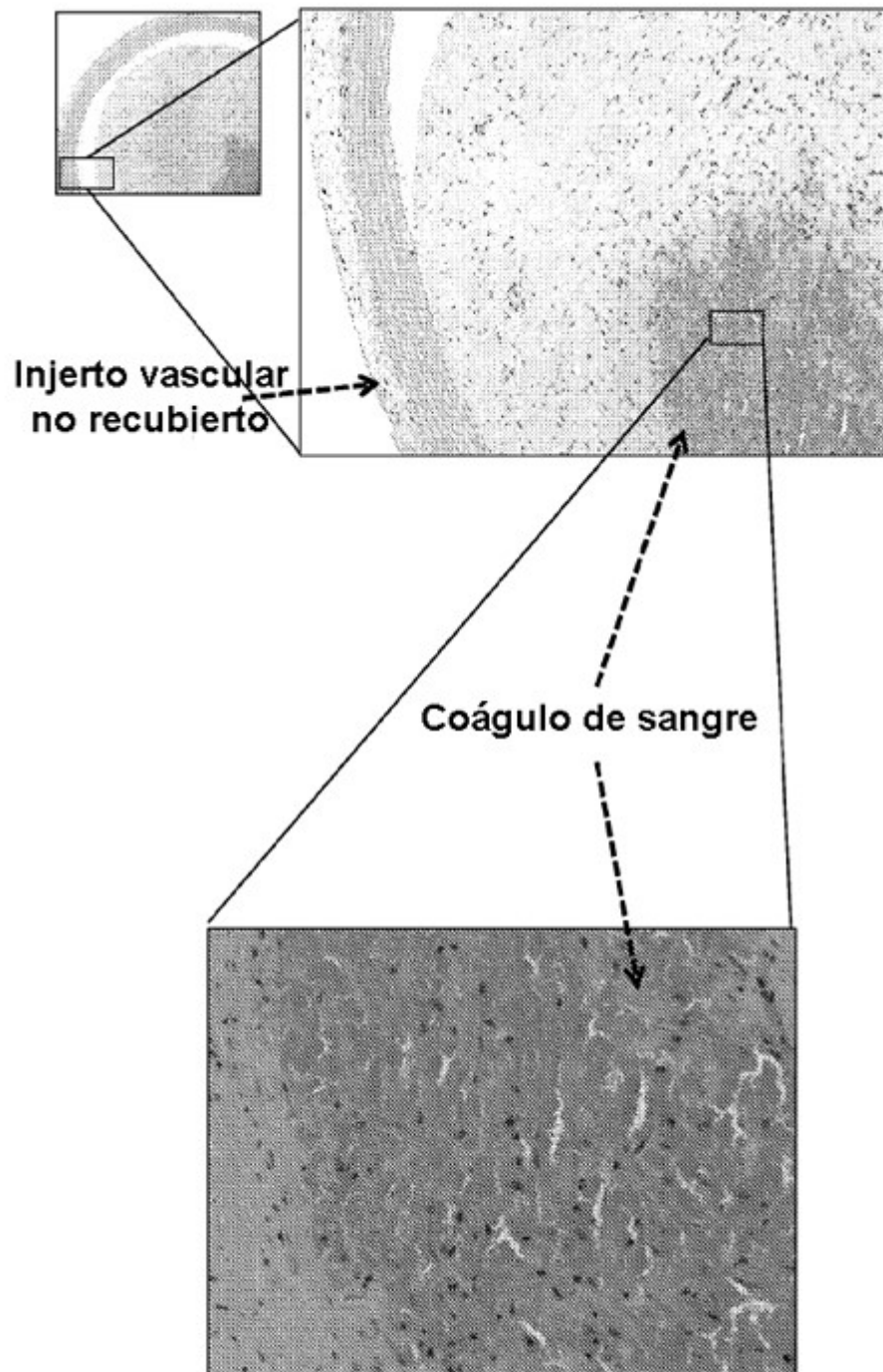


Figura 14

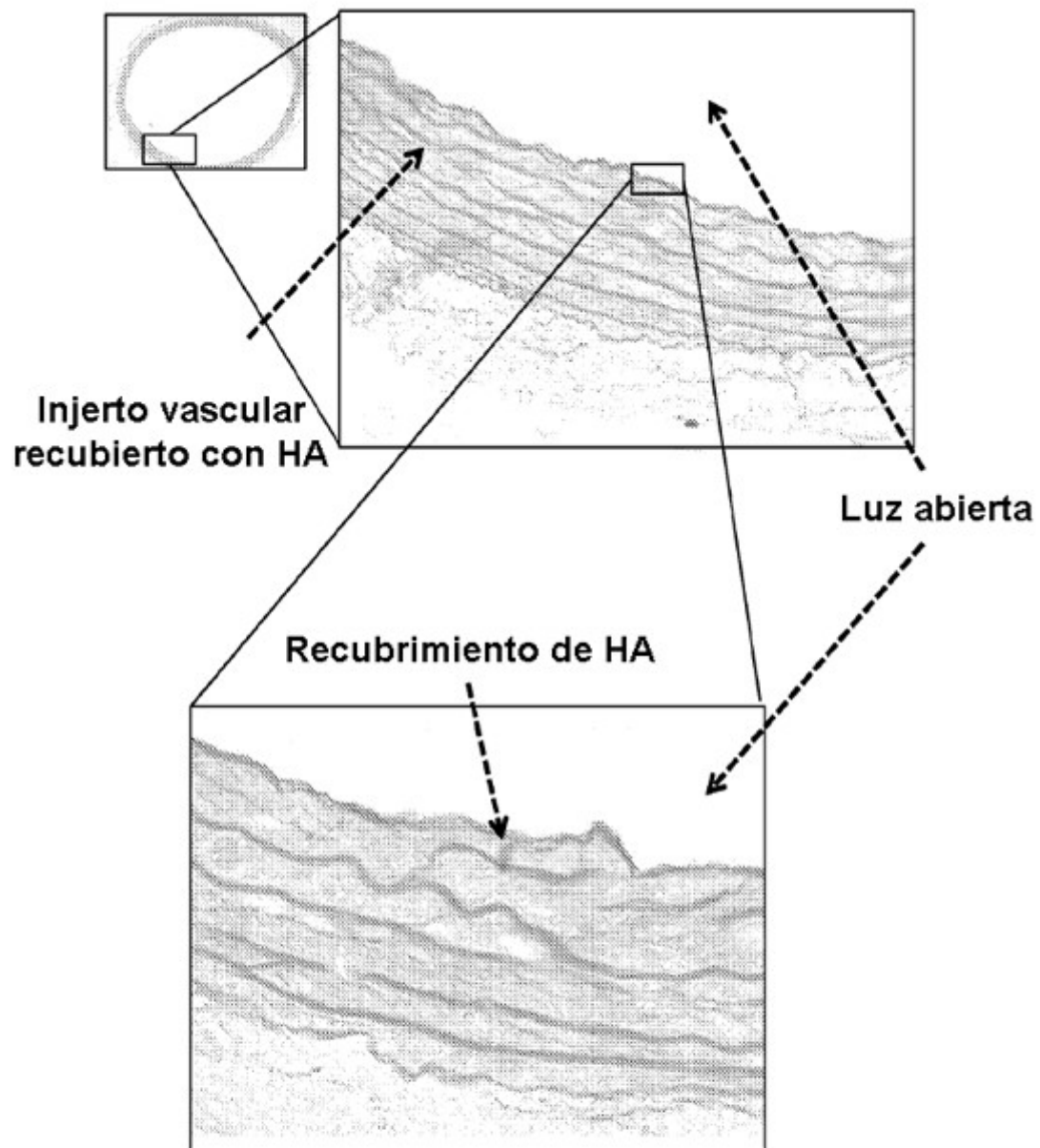


Figura 14

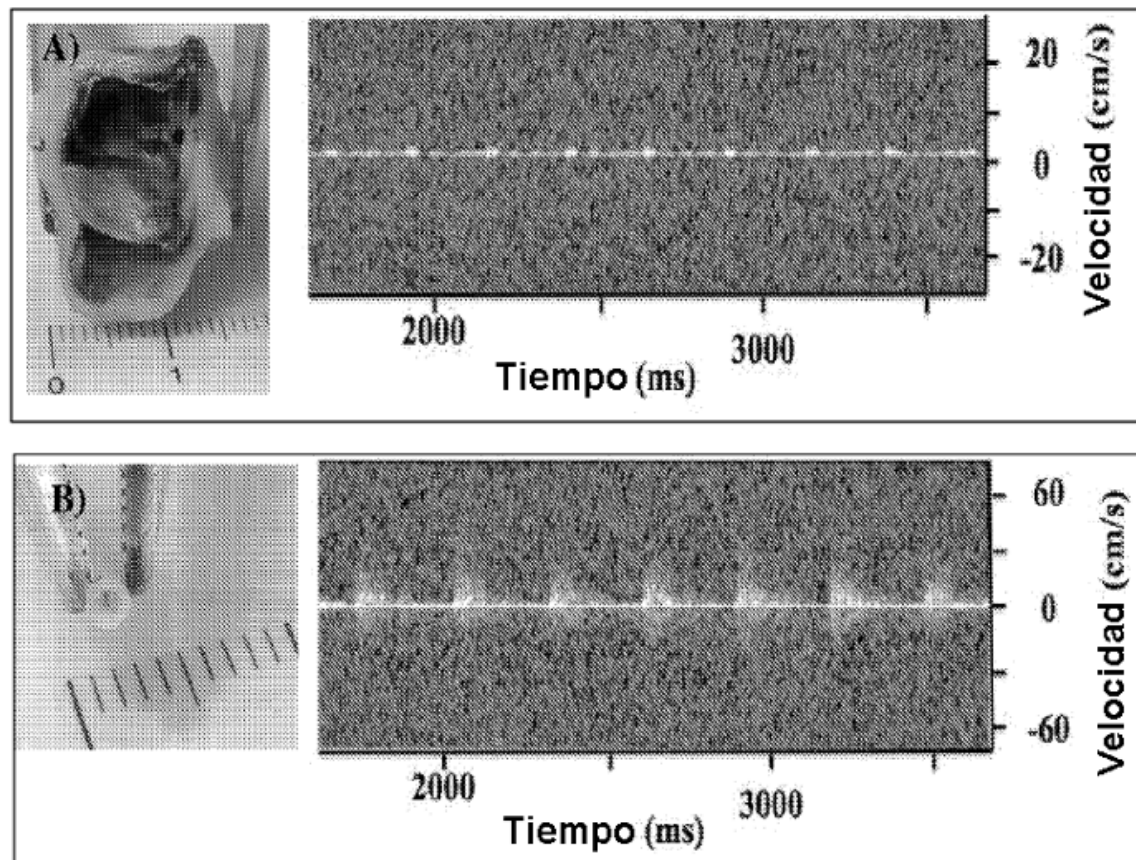


Figura 15

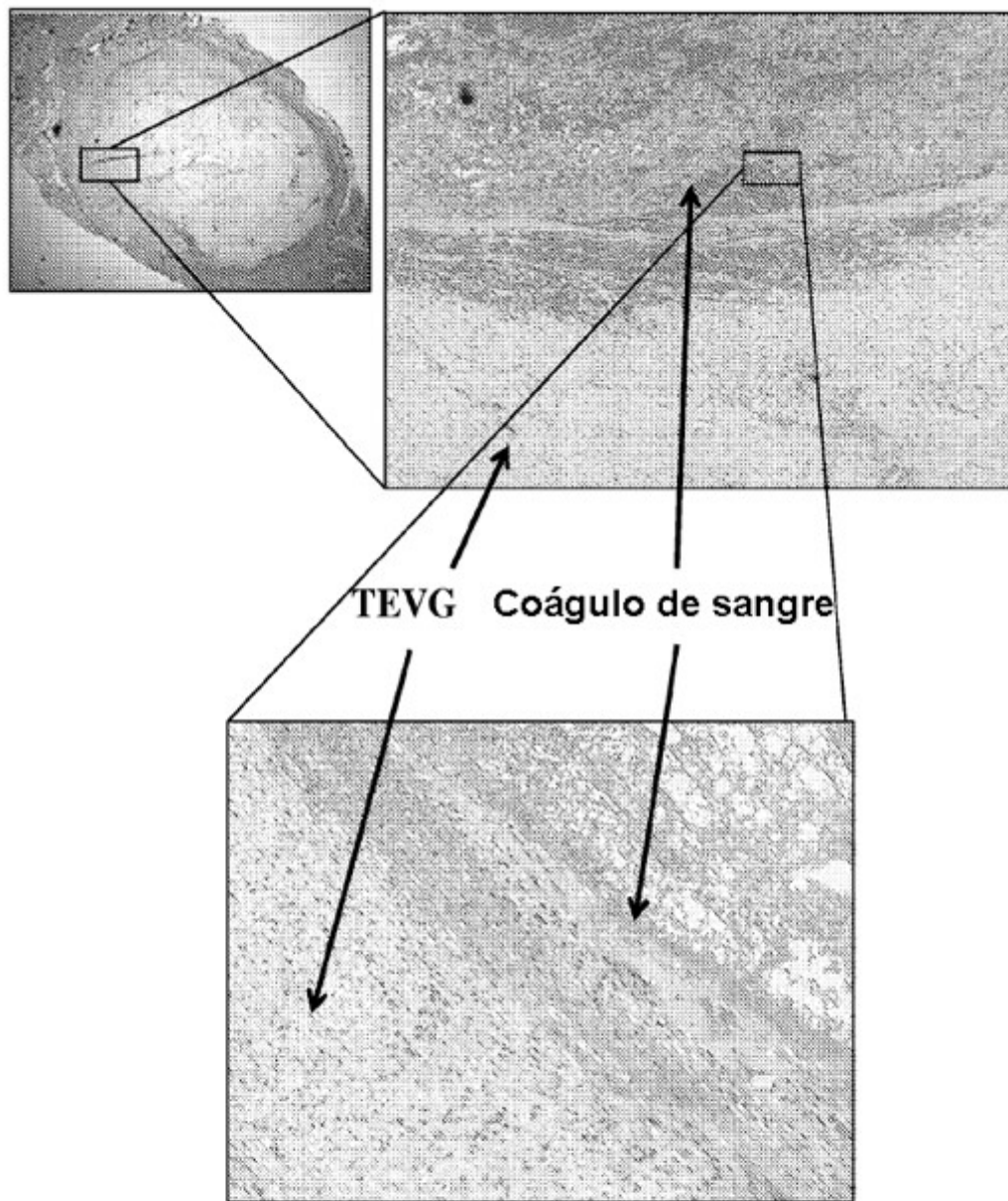


Figura 16

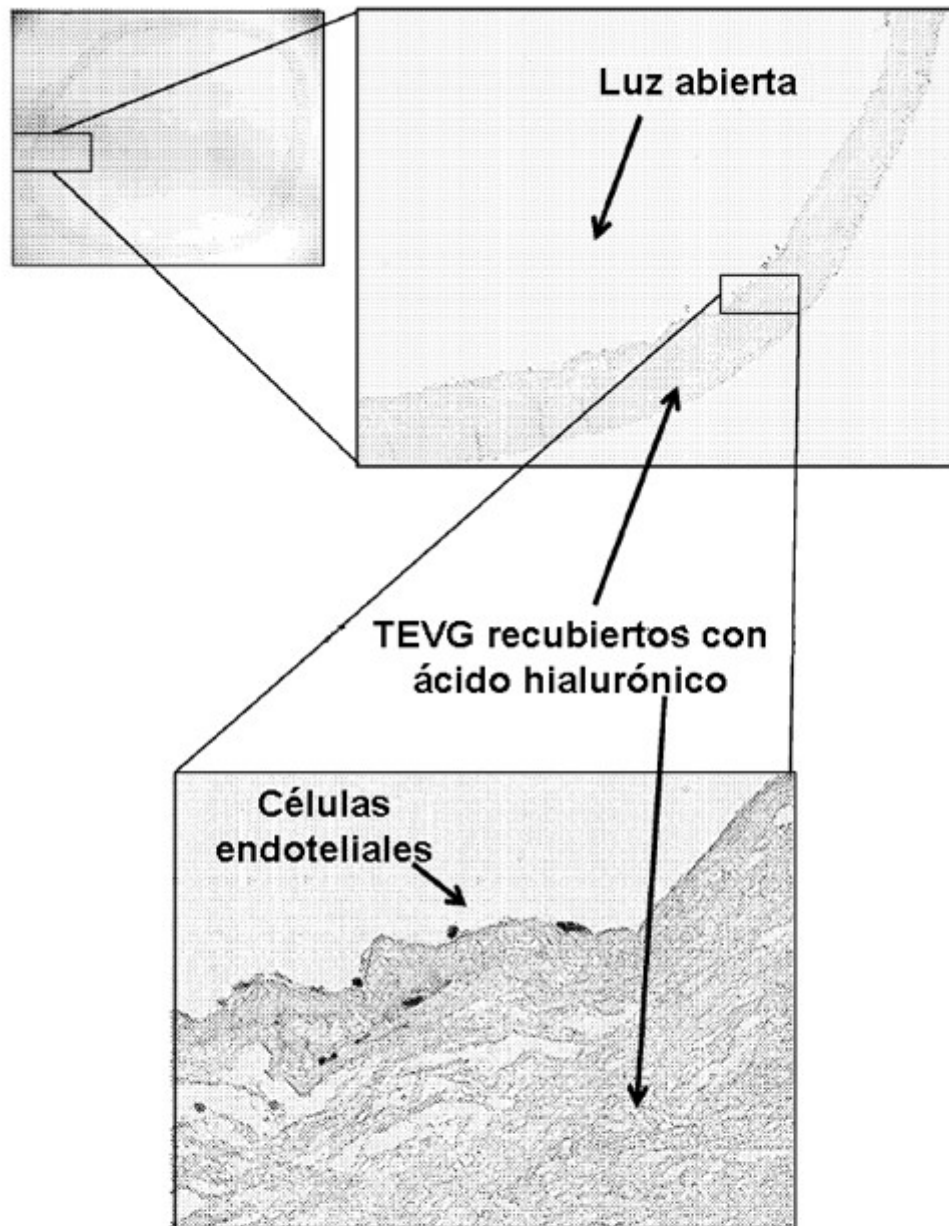


Figura 16