

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 988 106**

51 Int. Cl.:

C12M 3/00 (2006.01)

A61L 27/36 (2006.01)

A61L 27/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.08.2019** **E 23153503 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2024** **EP 4194541**

54 Título: **Métodos de preparación de vasos sanguíneos personalizados**

30 Prioridad:

03.08.2018 US 201862714200 P

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

19.11.2024

73 Titular/es:

VERIGRAFT AB (100.0%)
Arvid Wallgrens Backe 20
413 46 Gothenburg, SE

72 Inventor/es:

STREHL, RAIMUND

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 988 106 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

Métodos de preparación de vasos sanguíneos personalizados

5 Referencia cruzada con solicitudes de patente relacionadas

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de los EE.UU. N. °62/714.200, presentada el 3 de agosto de 2018.

10 Campo de divulgación

La presente divulgación se refiere a vasos sanguíneos personalizados y a métodos de preparación de vasos sanguíneos personalizados. En diversas realizaciones, los vasos sanguíneos personalizados producidos mediante los métodos contemplados en el presente documento pueden ser útiles en el trasplante con una compatibilidad con el

15 hospedador, una integración tisular y una reducción de la susceptibilidad a la trombosis mejoradas.

Antecedentes

Las enfermedades vasculares constituyen un problema de salud grave y en constante crecimiento a escala mundial.

20 Las opciones para el reemplazo de vasos sanguíneos dañados son limitadas hoy en día. El trasplante autólogo requiere un vaso adecuado en el paciente y conduce a morbilidad en el sitio donante. Hay disponibles reemplazos con vasos sintéticos, pero estos carecen de integración biológica en el tejido del hospedador y de permeabilidad a largo plazo. Existe la necesidad de injertos individualizados para el paciente totalmente biológicos.

25 La publicación internacional número WO/2013/136184 desvela "métodos para la recelurización de vasos sanguíneos"; por ejemplo "para producir una vena alógena, en donde una vena donante se descelulariza y después se recelulariza usando células madre de sangre entera o de médula ósea".

30 La publicación internacional número WO/2015/181245 desvela "métodos para la recelularización de válvulas en venas portadoras de válvulas"; por ejemplo "para producir una válvula venosa alógena, en donde una vena portadora de una válvula donante se descelulariza y después se recelulariza usando células madre de sangre entera o de médula ósea".

Sumario de la divulgación

35 La presente invención es como se define en las reivindicaciones. La invención y otras facetas de la presente divulgación pueden comprenderse más plenamente por referencia a la siguiente descripción.

La presente invención se refiere a un método de preparación de un vaso sanguíneo personalizado que comprende, poner en contacto una superficie de un armazón tubular acelular con una muestra de sangre entera sin diluir de un

40 sujeto que necesita el vaso sanguíneo personalizado, en donde el contacto se realiza durante 3 días a 14 días.

También se desvela, pero no se reivindica, un método de preparación de un vaso sanguíneo personalizado, que comprende poner en contacto una superficie de un armazón tubular acelular con una suspensión que comprende una muestra de sangre entera de un sujeto que necesita el vaso sanguíneo personalizado, en donde la muestra de sangre

45 entera se diluye en una solución fisiológica. En algunos casos, la solución fisiológica mantiene la presión oncótica coloidal del entorno extracelular, tampona el pH en una materia independiente de CO₂ y/o proporciona un efecto protector celular o antioxidante.

50 En algunas realizaciones, una población de células presentes en la muestra de sangre entera puebla el armazón.

En algunas realizaciones, la muestra de sangre entera comprende uno o más factores no celulares, en donde uno o más factores no celulares de la sangre entera pueblan el armazón, y en donde los uno o más factores no celulares promueven la celularización del armazón tubular acelular y la compatibilidad del hospedador con el vaso tras el injerto.

55 En algunas realizaciones, la muestra de sangre entera sin diluir comprende además un factor antitrombótico.

En algunas realizaciones, el factor antitrombótico comprende un agente anticoagulante.

En algunas realizaciones, el agente anticoagulante comprende heparina o un dextrano.

60 En algunas realizaciones, la heparina está presente en la muestra de sangre entera sin diluir a una concentración de 0,5 UI/ml +/- 10 % a 150 UI/ml +/- 10 % al comienzo del contacto con la superficie del armazón tubular acelular.

65 En algunas realizaciones, la heparina está presente en la muestra de sangre entera sin diluir; a una concentración de 6,7 UI/ml +/- 10 % al comienzo del contacto con la superficie del armazón tubular acelular.

En algunas realizaciones, el dextrano es dextrano-40.

En algunas realizaciones, el dextrano está presente en la muestra de sangre entera sin diluir a una concentración de 1 g/l +/- 10 % a 55 g/l +/- 10 % al comienzo del contacto con la superficie del armazón tubular acelular.

5

En algunas realizaciones, el agente antitrombótico comprende ácido ascórbico.

En algunas realizaciones, el ácido ascórbico está presente en la muestra de sangre entera sin diluir a una concentración de 0,2 µg/ml +/- 10 % a aproximadamente 200 µg/ml +/- 10 % al comienzo del contacto con la superficie del armazón tubular acelular.

10

En algunas realizaciones, la concentración de ácido ascórbico está presente en la muestra de sangre entera sin diluir a una concentración de 5 µg/ml +/- 10 % al comienzo del contacto con la superficie del armazón tubular acelular.

15

En algunas realizaciones, el factor antitrombótico comprende ácido acetilsalicílico.

En algunas realizaciones, el ácido acetilsalicílico está presente en la muestra de sangre entera sin diluir a una concentración de 0,2 µg/ml +/- 10 % a 200 µg/ml +/- 10 % al comienzo del contacto con la superficie del armazón tubular acelular.

20

En algunas realizaciones, el ácido acetilsalicílico está presente en la muestra de sangre entera sin diluir a una concentración de 5 µg/ml +/- 10 % al comienzo del contacto con la superficie del armazón tubular acelular.

En algunas realizaciones, la muestra de sangre entera comprende además un nivel fisiológico igual o superior al promedio de la población de un factor de crecimiento seleccionado del grupo que consiste en: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), interleucina (IL)-3, IL-4, neutrofina (NT)-6, pleiotrofina (HB-GAM), midcina (MK), proteína-10 inducible por interferón (IP-10), factor plaquetario (FP)-4, proteína-1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1), RANTES (CCL-5, ligando 5 de quimiocina (motivo C-C), IL-8, IGF, factor de crecimiento fibroblástico (FGF)-1, FGF-2, FGF-3, FGF-4, FGF-5, FGF-6, FGF-7, FGF-8, FGF-9, factor de crecimiento transformante (TGF)-β, VEGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)-A, PDGF-B, HB-EGF, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de necrosis tumoral (TNF)-α, factor de crecimiento (IGF)-1 similar a la insulina y cualquier combinación o combinaciones de los mismos.

25

30

En algunas realizaciones, el factor de crecimiento es un factor de crecimiento fibroblástico (FGF)-2.

35

En algunas realizaciones, el FGF-2 es FGF-2 humano.

En algunas realizaciones, el FGF-2 está presente en la muestra de sangre entera sin diluir o la suspensión que comprende la muestra de sangre entera a una concentración de 0,5 ng/ml +/- 10 % a 200 ng/ml +/- 10 % al comienzo del contacto con la superficie del armazón tubular acelular.

40

En algunas realizaciones, la concentración de FGF-2 está presente en la muestra de sangre entera sin diluir a una concentración de 10 ng/ml +/- 10 % al comienzo del contacto con la superficie del armazón tubular acelular.

45

En algunas realizaciones, el factor de crecimiento es un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

En algunas realizaciones, el VEGF es VEGF humano.

En algunas realizaciones, el VEGF está presente en la muestra de sangre entera sin diluir a una concentración de 4 ng/ml +/- 10 % a 800 ng/ml +/- 10 % al comienzo del contacto con la superficie del armazón tubular acelular.

50

En algunas realizaciones, el VEGF está presente en la muestra de sangre entera sin diluir una concentración de 80 ng/ml +/- 10 % al comienzo del contacto con la superficie del armazón tubular acelular.

55

En algunas realizaciones, la muestra de sangre entera comprende además albúmina sérica humana, en donde la concentración de albúmina sérica humana al comienzo del contacto con la superficie del armazón tubular acelular es de 55 g/l +/- 10 % a 105 g/l +/- 10 %.

En algunos casos de los métodos no reivindicados de la divulgación, la solución fisiológica comprende una sal inorgánica y un sistema tampón.

60

En algunos casos, el sistema tampón consiste en un sistema tampón independiente de CO₂

En algunos casos, el sistema tampón independiente de CO₂ comprende un sistema tampón de fosfato.

65

En algunos casos, la solución fisiológica presenta una presión osmótica sustancialmente similar a la de la sangre

entera, que preferentemente es de 270 mOsm/kg de H₂O +/- 10 % a 310 mOsm/kg de H₂O +/- 10 %.

En algunos casos, la solución fisiológica comprende además un factor oncótico y/o un nutriente.

5 En algunos casos, el factor oncótico comprende albúmina sérica.

En algunas realizaciones, la concentración de VEGF de albúmina sérica humana está presente en la muestra de sangre entera sin diluir a una concentración de 55 g/l +/- 10 % a 105 g/l +/- 10 % al comienzo del contacto con la superficie del armazón tubular acelular.

10 En algunos casos de los métodos no reivindicados de la divulgación, el nutriente comprende uno o más de un azúcar, un aminoácido o una vitamina.

15 En algunos casos, el azúcar es D-glucosa.

En algunos casos de los métodos no reivindicados de la divulgación, la solución fisiológica comprende un factor de crecimiento y un factor antitrombótico, un nutriente y un factor oncótico; en donde el factor de crecimiento comprende FGF-2 humano y VEGF humano; en donde el factor antitrombótico comprende uno o más de ácido acetilsalicílico, heparina o dextrano; y en donde el nutriente comprende D-glucosa.

20 En algunas realizaciones, el método no requiere poner en contacto el armazón tubular acelular con un medio de cultivo celular después del contacto con sangre entera para preparar el vaso sanguíneo personalizado.

25 En algunas realizaciones, el contacto con la superficie del armazón tubular acelular es durante más de 3 días, más de 4 días, más de 5 días, más de 6 días, más de 7 días o durante 7-9 días.

30 En algunos casos de los métodos no reivindicados de la divulgación, en donde el armazón tubular acelular se pone en contacto con la suspensión que comprende la muestra de sangre entera, y el método comprende además controlar una pluralidad de parámetros ambientales y/o una concentración de un nutriente durante la preparación del vaso sanguíneo personalizado.

En algunos casos, los métodos de la presente divulgación comprenden además ajustar la pluralidad de parámetros ambientales.

35 En algunos casos, la pluralidad de parámetros ambientales comprende temperatura, pH, oxígeno y/o CO₂.

En algunos casos, el armazón tubular acelular se pone en contacto con la suspensión que comprende la muestra de sangre entera, y el método comprende además controlar una concentración de un nutriente en la suspensión.

40 En algunos casos, los métodos de la presente divulgación comprenden además ajustar de forma continua o de forma regular la concentración del nutriente.

En algunos casos, el nutriente es D-glucosa, y en donde la concentración de D-glucosa se ajusta de forma continua o de forma regular para mantener la concentración de D-glucosa a 3 a 11 mmol/l +/- 10 %.

45 En algunos casos, la concentración de D-glucosa en la suspensión se controla midiendo la concentración de D-glucosa en una muestra recogida de la suspensión.

50 En algunos casos, la concentración de D-glucosa en la suspensión se mide una vez al día.

En algunos casos, la concentración de D-glucosa en la suspensión se controla midiendo la concentración de D-glucosa usando un sensor que está en contacto con la suspensión.

55 En algunos casos, el sensor está en contacto de forma continua con la suspensión durante el contacto.

En algunos casos, se añade D-glucosa cuando la concentración medida de D-glucosa en la suspensión es inferior a 4 mmol/l.

60 En algunos casos, se añade D-glucosa para alcanzar una concentración final de 10 mmol/l de D-glucosa en la suspensión.

En algunas realizaciones, la superficie del armazón tubular acelular es la superficie interna del armazón tubular acelular.

65 En algunas realizaciones, la sangre entera comprende sangre periférica o sangre de cordón umbilical.

En algunas realizaciones, el método comprende además controlar una concentración de albúmina sérica humana, en donde la concentración de albúmina sérica humana es de 55 g/l a 105 g/l al comienzo del contacto con la superficie del armazón tubular acelular.

- 5 En algunas realizaciones, en donde el contacto con el armazón tubular acelular da como resultado la proliferación y/o diferenciación de una pluralidad de células progenitoras en una pluralidad de células endoteliales.

En algunas realizaciones, la pluralidad de células endoteliales expresa VE-cadherina, AcLDL, vWF y/o CD31.

- 10 En algunas realizaciones, el armazón tubular acelular es un vaso sanguíneo descelularizado.

En algunas realizaciones, el armazón tubular acelular se perfunde de forma continua con la sangre entera.

- 15 En algunas realizaciones, el armazón tubular acelular se perfunde a una velocidad de 0,1 ml a 50 ml por minuto +/- 10 %.

En algunas realizaciones, el armazón tubular acelular se perfunde a una velocidad de 2 ml por minuto.

- 20 En algunas realizaciones, el armazón se perfunde con una recirculación cerrada de la sangre entera.

En algunas realizaciones, el contacto continuo es perfusión realizada usando un biorreactor.

En algunas realizaciones, el contacto se realiza *in vitro*.

- 25 En algunas realizaciones, el contacto se realiza a 8 °C +/- 10 % a 40 °C +/- 10 %.

En algunas realizaciones, en donde el contacto se realiza a 20 °C +/- 10 % a 25 °C +/- 10 %.

- 30 En algunas realizaciones, el vaso sanguíneo personalizado es una vena.

En algunas realizaciones, la vena es una vena femoral.

- 35 En algunas realizaciones, los métodos de la presente divulgación comprenden además evaluar la función de la válvula venosa del vaso sanguíneo personalizado usando un ensayo de competencia de la válvula.

En el presente documento también se desvela un vaso sanguíneo personalizado preparado mediante el método de uno cualquiera de los métodos de preparación de un vaso sanguíneo personalizado desvelados en el presente documento.

- 40 Un vaso sanguíneo personalizado de este tipo es para la implantación en un sujeto mediante cirugía.

En el presente documento también se desvela, pero no se reivindica, un método de cirugía que comprende implantar el vaso sanguíneo personalizado desvelado en el presente documento en un sujeto que lo necesite.

- 45 Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a un vaso sanguíneo personalizado para su uso en un método de cirugía, en donde el método comprende implantar el vaso sanguíneo personalizado desvelado en el presente documento en un sujeto que lo necesite.

En algunos casos, el sujeto es humano.

- 50 En el presente documento también se desvela un biorreactor para preparar un vaso sanguíneo personalizado, comprendiendo el biorreactor una bomba peristáltica, un recipiente que comprende un puerto de muestreo, un primer conector y un segundo conector, en donde los conectores primero y segundo están conectados directa o indirectamente al recipiente, en donde cada conector está conectado a un extremo de un armazón tubular para preparar un vaso sanguíneo personalizado preparado mediante los métodos desvelados en el presente documento, en donde cuando los conectores primero y segundo están conectados a los dos extremos de un armazón tubular, la bomba peristáltica media la circulación de una suspensión o solución en un circuito cerrado.

- 60 En algunos casos, los conectores primero y segundo son conectores Luer.

En algunos casos, el puerto de muestreo es un puerto de inyección.

En algunos casos, el biorreactor comprende además un puerto de inyección.

- 65 En algunos casos, el puerto de inyección está conectado a un depósito de D-glucosa.

En algunos casos, el primer recipiente está conectado directamente al recipiente por un tubo, y/o el segundo recipiente está conectado directamente al recipiente por un tubo.

En algunos casos, el biorreactor comprende uno o más puertos de muestra.

5

En algunos casos, el biorreactor comprende además uno o más sensores para medir el nivel de glucosa.

En algunos casos, el biorreactor comprende además un módulo de ajuste de pH.

10 En algunos casos, el biorreactor comprende además un módulo de ajuste de CO₂.

En el presente documento también se desvela, pero no se reivindica, un método de preparación de un vaso sanguíneo personalizado, comprendiendo el método poner en contacto una superficie de un armazón tubular acelular con un componente contenido en la sangre entera, que se enriquece o selecciona antes de su uso en contacto con la superficie.

15

En algunos casos, el componente se selecciona de trombocitos, células nucleadas, proteínas, factores de crecimiento, factores de señalización, inmunoglobulinas y cualesquier combinaciones de los mismos.

20 En algunos casos, el componente se enriquece mediante centrifugación, centrifugación en gradiente; o se selecciona mediante adhesión selectiva, filtración o clasificación.

En algunos casos, la superficie es una superficie interna del armazón tubular acelular.

25 **Breve descripción de los dibujos**

Las FIG. 1A-1B son angiogramas de una *vena cava* operada simulada (FIG. 1A) y una P-TEV (vena personalizada modificada por ingeniería tisular, por sus siglas en inglés) trasplantada (FIG. 1B). Los clips metálicos se indican con puntas de flecha para localizar las anastomosis.

30

Las FIG. 2A-2B son una serie de imágenes que muestran la tinción con hematoxilina y eosina (H y E) y la tinción con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) de *vena cava* nativa ("Nativa", FIG. 2A) y trasplantes de P-TEV ("P-TEV", FIG. 2B) de secciones adyacentes 3 días, 2 semanas, 17 días y 4-5 semanas después de la cirugía.

35 Las FIG. 3A-3D representan imágenes que muestran la celularización de la vena cava dos semanas después de la cirugía. Las FIG. 3A-3D son una serie de inmunohistogramas que muestran la tinción con DAPI y la inmunotinción con CD31 de *vena cava* dos semanas después de la cirugía. La FIG. 3A muestra *vena cava* nativa próxima a las anastomosis. Las FIG. 3B-3D muestran las partes proximal (FIG. 3B), central (FIG. 3C) y distal (FIG. 3D) de la P-TEV. Las puntas de flecha indican células positivas para CD31.

40

Las FIG. 4A-4D representan imágenes que muestran la celularización de la vena cava cuatro semanas después de la cirugía. Las FIG. 4A-4D son una serie de inmunohistogramas que muestran la tinción con DAPI y la inmunotinción con CD31 de *vena cava* 4-5 semanas después de la cirugía. La FIG. 4A muestra *vena cava* nativa próxima a las anastomosis. Las FIG. 4B-4D muestran las partes proximal (FIG. 4B), central (FIG. 4C) y distal (FIG. 4D) de la P-TEV. Las puntas de flecha indican células positivas para CD31.

45

Las FIG. 5A-5B representan imágenes que muestran la morfología de células luminales cuatro semanas después de la cirugía. Las FIG. 5A-5B es una serie de imágenes con un aumento de 40× que muestra la tinción con H y E de *vena cava* nativa (FIG. 5A) y trasplante de P-TEV (FIG. 5B) 4-5 semanas después de la cirugía. Las flechas indican células endoteliales en el tejido nativo y células con morfología similar a células endoteliales en placa en el trasplante de P-TEV.

50

Descripción detallada de la divulgación

55 La presente divulgación se basa, entre otros, en el descubrimiento de que las células y los factores no celulares en la sangre eran capaces de condicionar los armazones tubulares acelulares (por ejemplo, un vaso sanguíneo descelularizado o un armazón tubular bioimpreso) para producir vasos sanguíneos personalizados. La presente divulgación proporciona además, entre otros, poner en contacto armazones tubulares acelulares con muestras de sangre entera sin diluir o una suspensión que comprende una muestra de sangre entera diluida en una solución fisiológica en un proceso *in vitro* produce vasos sanguíneos personalizados con una compatibilidad con el hospedador mejorada y una susceptibilidad a la trombosis reducida.

60

En consecuencia, la presente invención se refiere a un método de preparación de un vaso sanguíneo personalizado que comprende, poner en contacto una superficie de un armazón tubular acelular con una muestra de sangre entera sin diluir de un sujeto que necesita el vaso sanguíneo personalizado, en donde el contacto se realiza durante 3 días a 14 días.

65

En el presente documento también se desvela un método de preparación de un vaso sanguíneo personalizado, que comprende poner en contacto una superficie de un almacén tubular acelular con una suspensión que comprende una muestra de sangre entera de un sujeto que necesita el vaso sanguíneo personalizado, en donde la muestra de sangre entera se diluye en una solución fisiológica. En algunas realizaciones, la superficie del almacén tubular acelular es la superficie interna del almacén tubular acelular.

Como se usa en el presente documento, la expresión "vaso sanguíneo personalizado" se refiere a una estructura tubular capaz de transportar sangre a través de un tejido u órgano que no es un vaso sanguíneo nativo. La estructura tubular puede prepararse descelularizando un vaso sanguíneo nativo de un donante, obteniéndose de este modo un almacén acelular, y reacondicionando/recelularizando el almacén usando células de otro individuo. También puede obtenerse un almacén acelular ensamblando un material biocompatible *in vitro* (por ejemplo, bioimpresión o autoensamblaje de polímeros). Como se usan en el presente documento, los términos "reacondicionar", "reacondicionamiento", y "reacondicionado" se usan para describir la modificación del almacén acelular mediante componentes de la solución de recelularización/reacondicionamiento (RC, por sus siglas en inglés) que contiene sangre entera. Como se usan en el presente documento, los términos "recelularizar", "recelularización", y "recelularizado" se usan en cualquier contexto, y no requieren que el material de partida inicial tenga células unidas. Un vaso sanguíneo personalizado puede ser una vena, una arteria o un capilar personalizados. En determinadas realizaciones, un vaso sanguíneo personalizado es útil para reemplazar un vaso sanguíneo nativo.

Preparación del almacén tubular acelular del donante

El método de preparación de un vaso sanguíneo personalizado como se desvela en el presente documento emplea un almacén tubular acelular. Como se usa en el presente documento, la expresión "almacén tubular acelular" se refiere a un almacén tubular que está sustancialmente exento de células. Puede prepararse un almacén tubular acelular descelularizando un vaso sanguíneo nativo de un donante. El donante puede ser un ser humano o un animal de una especie adecuada. También puede obtenerse un almacén acelular ensamblando un material biocompatible *in vitro* (por ejemplo, bioimpresión o autoensamblaje de polímeros).

El almacén tubular acelular puede prepararse mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, descelularización de un vaso sanguíneo nativo. El vaso sanguíneo nativo puede ser de origen humano o puede obtenerse de especies animales adecuadas. Una estructura tubular puede prepararse mediante métodos de cultivo de tejidos a partir de almacenes y células biocompatibles. *in vitro* y puede servir como material de partida para la preparación de un almacén acelular. En determinadas realizaciones, el almacén tubular acelular se obtiene mediante un método de descelularización desvelado en el presente documento. En determinadas realizaciones, el método de preparación de un vaso sanguíneo personalizado desvelado en el presente documento comprende además descelularizar un vaso sanguíneo nativo, obteniéndose de este modo un almacén tubular acelular.

Como se usa en el presente documento, el término "descelularizar", "descelularizado", "descelularizando", o "descelularización" se refiere al proceso de retirar células de un vaso sanguíneo (incluyendo cualquier válvula venosa en el vaso sanguíneo). La descelularización eficaz está dictada por factores tales como la densidad y organización del tejido, las propiedades geométricas y biológicas deseadas para el producto final y la aplicación clínica objetivo. Los expertos en la materia pueden optimizar la descelularización de los vasos sanguíneos con conservación de la integridad y la bioactividad de la MEC, por ejemplo, eligiendo agentes y técnicas específicos durante el procesamiento.

La descelularización satisfactoria se define como la ausencia de células, tales como células endoteliales, células de músculo liso y núcleos en secciones histológicas usando procedimientos de tinción histológica convencionales. Aunque la mayoría de los agentes y métodos de retirada de células pueden alterar la composición de la MEC y provocar cierto grado de ruptura de la ultraestructura, se desea la minimización de estos efectos no deseados. Se conocen en la técnica métodos de descelularización, por ejemplo, en la publicación de patente de los EE.UU. N.º 2017/0071738.

En consecuencia, en determinadas realizaciones, el proceso de descelularización retira todos los núcleos, detectados mediante un método conocido en la técnica (por ejemplo, tinción con DAPI, cuantificación de ADN). En determinadas realizaciones, el proceso de descelularización reduce o retira los antígenos HLA de clase I y los antígenos HLA de clase II, detectados mediante un método conocido en la técnica (por ejemplo, ensayos inmunohistoquímicos para antígenos HLA de clase I y de clase II).

En determinadas realizaciones, los componentes de la MEC quedan retenidos sustancialmente en el proceso de descelularización. Durante y después del proceso de descelularización, la morfología y la arquitectura de la MEC pueden examinarse visual y/o histológicamente para verificar que el proceso de descelularización no haya comprometido la estructura tridimensional y la bioactividad del almacén de la MEC. El análisis histológico mediante tinción (por ejemplo, tinción con H y E, tinción tricrómica de Masson o tinción de Verhoeff-Van Gieson) puede ser útil para visualizar la arquitectura de los vasos sanguíneos descelularizados y la conservación de los componentes de la MEC, tales como el colágeno I, el colágeno IV, la laminina y la fibronectina. Pueden usarse otros métodos conocidos en la técnica para determinar la conservación de los componentes de la MEC, tales como los glucosaminoglicanos y

el colágeno.

Pueden usarse una o más soluciones de ruptura celular para descelularizar un vaso sanguíneo. Una solución de ruptura celular generalmente incluye al menos un detergente, tal como SDS, PEG o Triton X. Un detergente particularmente preferido es Triton X (por ejemplo, Triton X-100). Una solución de ruptura celular puede comprender un disolvente orgánico, por ejemplo, Fosfato de tri-n-butilo (TNBP). Una solución de ruptura celular también puede tener una presión osmótica sustancialmente más baja que la sangre, facilitando de este modo la lisis celular. Como alternativa, una solución de ruptura celular puede ser isotónica. La solución de ruptura celular también puede incluir enzimas tales como, sin limitación, una o más nucleasas (por ejemplo, ADNasas o RNasas) y proteinasas (por ejemplo, colagenasas, dispasas o tripsina). Una solución de ruptura celular que comprende ADNasa I también puede incluir cloruro de calcio y cloruro de magnesio (A12858, Life Technologies) para activar la enzima. En determinadas realizaciones, una solución de ruptura celular comprende además uno o más inhibidores de proteasas (por ejemplo, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), inhibidores de colagenasas). En determinadas realizaciones, una solución de ruptura celular puede incluir además un antibiótico (por ejemplo, penicilina, estreptomycin o anfotericina) o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

En determinadas realizaciones, pueden usarse métodos de perfusión para tratar el vaso sanguíneo (por ejemplo, vena portadora de una válvula) con soluciones de ruptura celular para la descelularización del vaso sanguíneo. Alterar la dirección de la perfusión (por ejemplo, anterógrada y retrógrada) puede ayudar a descelularizar eficazmente una vena portadora de una válvula. La descelularización, como se describe en el presente documento, esencialmente retira las células que recubren las venas que contienen válvulas de adentro hacia afuera, dando como resultado muy poco daño de la MEC. Dependiendo del tamaño y el peso del vaso sanguíneo y del detergente o detergentes particulares y la concentración del detergente o detergentes en la solución de ruptura celular, una vena portadora de una válvula generalmente se perfunde entre 4 y 48 horas; o entre 8 y 24 horas con medio de ruptura celular. Incluyendo los lavados, un vaso sanguíneo puede perfundirse a aproximadamente 48 horas o 24 horas para Triton X, aproximadamente 8 horas para TNBP, aproximadamente 16 horas para ADNasa, aproximadamente 1 hora de lavados totales y aproximadamente 48 horas de lavado final. En algunas realizaciones, el procedimiento de perfusión mencionado anteriormente se repite durante 1-14 ciclos; 1-5 ciclos; 2-4 ciclos; 1-3 ciclos; o 2 ciclos; o 3 ciclos; o 4 ciclos; o 5 ciclos; o 6 ciclos. En determinadas realizaciones, la descelularización se realiza mediante perfusión con los reactivos mencionados anteriormente de manera continua durante 100 horas, 110 horas, 120 horas, 130 horas, 140 horas, 150 horas, 160 horas, 170 horas, 180 horas, 190 horas, 200 horas, 210 horas, 220 horas, 230 horas, 240 horas, 250 horas, 260 horas, 270 horas, 280 horas, 290 horas, 300 horas, 310 horas, 320 horas, 330 horas, 340 horas, 350 horas o más. La perfusión generalmente se ajusta a las condiciones fisiológicas, incluyendo el flujo pulsátil, la velocidad y la presión. La descelularización por perfusión como se describe en el presente documento puede compararse en algunas realizaciones con la descelularización por inmersión como se describe, por ejemplo, en las patentes de los EE.UU. N.º 6.753.181 y 6.376.244. En determinadas realizaciones, la descelularización se realiza de acuerdo con el método de descelularización de un vaso sanguíneo que se proporciona en el Ejemplo 1 que se cita más adelante.

En determinadas realizaciones, el armazón tubular acelular es un armazón sintetizado y/o ensamblado, por ejemplo, un armazón obtenido ensamblando un material biocompatible *in vitro*. Se conocen en la técnica métodos para preparar dicho armazón, por ejemplo, bioimpresión o autoensamblaje de polímeros, y se proporcionan ejemplos no limitantes en las publicaciones de patentes de los EE.UU. N.º 2017/0304503 y 2016/0354194.

En consecuencia, en determinadas realizaciones, el método desvelado en el presente documento comprende además una etapa de preparación de un armazón de vaso sanguíneo tubular bioimpreso usando un armazón polimérico bioimpreso. El armazón de vaso sanguíneo bioimpreso se prepara en un polímero (natural o sintético), que puede estar en forma de gel, forma de esponja, forma de espuma, forma de parche o forma semilíquida/fluida. En determinadas realizaciones, un armazón bioimpreso se perfunde con sangre entera o sangre entera diluida en una solución, por ejemplo, una suspensión, que incluye sangre entera.

En determinadas realizaciones, los componentes de la MEC pueden añadirse al polímero en forma de polvo. En la presente divulgación, el polvo para preparar la composición de la presente divulgación se prepara tratando un tejido con un producto químico, liofilizando el tejido tratado con el producto químico y homogeneizando el tejido liofilizado. En determinadas realizaciones, el polvo es filamentos.

En determinadas realizaciones, el armazón polimérico bioimpreso puede incluir gelatina y fibrina. La gelatina y la fibrina pueden formar una red polimérica interpenetrante que imita la MEC natural y puede optimizarse para la unión celular, la bioimpresión, la transparencia y la biocompatibilidad.

En determinadas realizaciones, los componentes de la MEC se aíslan y/o se purifican, o pueden aislarse/purificarse, de un tejido de un mamífero (por ejemplo, un cerdo, una vaca, un cordero, una cabra, una oveja, un chimpancé, un mono, un ser humano u otro primate) o se generan, o pueden generarse, usando tecnología de ADN recombinante que implica genes o fragmentos génicos de un mamífero (por ejemplo, un cerdo, una vaca, un cordero, una cabra, una oveja, un chimpancé, un mono, un ser humano u otro primate) que codifican el componente de la MEC respectivo (por ejemplo, colágenos, elastinas, lamininas, glucosaminoglicanos, proteoglicanos, antimicrobianos,

quimioatrayentes, citocinas y factores de crecimiento) y se expresan en un sistema de expresión adecuado (procariota o eucariota (por ejemplo, células de levadura, de insectos o de mamíferos)), y posteriormente se aíslan y/o purifican mediante un método adecuado en la técnica. En determinadas realizaciones, pueden añadirse uno o más de los componentes de la MEC al almacén polimérico para preparar un almacén polimérico bioimpreso y, después, el
 5 almacén se perfunde con sangre entera o sangre entera diluida en una solución, por ejemplo, una suspensión, que incluye sangre entera, para preparar un vaso sanguíneo personalizado.

En algunas realizaciones, el almacén tubular puede prepararse mediante métodos tales como la impresión 3D de diferentes materiales, el autoensamblaje, la fabricación química o bioquímica. En algunas realizaciones, el almacén
 10 tubular se fabrica a partir de material de partida biológico y no biológico.

Sangre entera del paciente

En algunas realizaciones, una población de células presentes en la muestra de sangre entera puebla el almacén. La
 15 sangre entera del paciente puede usarse sin diluir o diluida con una solución de perfusión fisiológica tal como la descrita en los ejemplos 4-5 u otras soluciones conservantes de órganos tales como, por ejemplo, Perfadex™, STEEN™, solución Euro Collins, solución de almacenamiento en frío de la Universidad de Wisconsin o solución Celsior®.

En determinadas realizaciones, la sangre entera comprende sangre periférica (por ejemplo, sangre venosa periférica).
 20 En determinadas realizaciones, la sangre entera es sangre periférica (por ejemplo, sangre venosa periférica). En determinadas realizaciones, la sangre entera comprende sangre de cordón umbilical. En determinadas realizaciones, toda la sangre es sangre de cordón umbilical.

Los términos "paciente" y "sujeto" se usan indistintamente en la presente divulgación y se refieren a un animal humano
 25 o no humano (por ejemplo, un mamífero). Los ejemplos no limitantes incluyen seres humanos, bovinos, ratas, ratones, perros, gatos, monos, cabra, ovejas, vacas y ciervos. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano.

Sangre entera del paciente sin diluir

Un aspecto de la presente divulgación se refiere a un método de preparación de un vaso sanguíneo personalizado
 30 que comprende, poner en contacto una superficie de un almacén tubular acelular con una muestra de sangre entera sin diluir de un sujeto que necesita el vaso sanguíneo personalizado, en donde el contacto se realiza durante más de 2 días.

En determinadas realizaciones, las células y/o células progenitoras presentes en la sangre pueblan el almacén. En
 35 algunas realizaciones, una población de células presentes en la muestra de sangre entera puebla el almacén. La expresión "sangre entera" se refiere a la sangre extraída de un cuerpo, órgano o tejido, del que no se ha retirado ninguno de los componentes.

El experto apreciaría que durante la recogida de la sangre entera, puede añadirse un pequeño volumen de un agente
 40 antitrombótico durante o inmediatamente después de que se extraiga la muestra de sangre de un sujeto. Cuando el volumen del agente antitrombótico no supera aproximadamente el 5 % o al menos no supera el 10 % del volumen de la sangre con la que se mezcla el agente antitrombótico, la sangre entera preparada de este modo se considera sin diluir. De forma similar, en determinadas realizaciones, la sangre entera puede complementarse con uno o más
 45 agentes (por ejemplo, agentes antitrombóticos, nutrientes, diluyente, conservantes y sistema tampón independiente de CO₂), en donde el volumen total de la sustancia o sustancias añadidas, sin incluir ningún agente antitrombótico introducido inicialmente en el momento de la recogida, no supera aproximadamente el 5 % o al menos no supera aproximadamente el 10 % del volumen de la sangre entera, la sangre entera suplementada se considera sin diluir.

En determinadas realizaciones, el método no requiere poner en contacto el almacén tubular acelular con un medio de
 50 cultivo celular para preparar el vaso sanguíneo personalizado. En determinadas realizaciones, la sangre entera se usa en el método desvelado en el presente documento aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días o
 55 aproximadamente 1 semana después de la recogida de la sangre entera. En determinadas realizaciones, la sangre entera se almacena a aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C antes de su uso en el método.

Sangre entera diluida del paciente

En otro aspecto, la presente invención se refiere a poner en contacto el almacén tubular acelular con sangre entera
 60 diluida del paciente.

La sangre entera del paciente se considera diluida si la sangre entera extraída del paciente se diluye con cualquier
 65 tipo de solución, tampón o líquido acuoso al menos al 15 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 110 %, 120 %, 130 %, 140 %, 150 %, 160 %, 170 %, 180 %, 190 % o 200 %. En algunas realizaciones, la muestra de sangre entera se diluye 1:1, es decir, 1 volumen de sangre entera se mezcla con 1 volumen de diluyente. En alguna

realización, la muestra de sangre entera puede diluirse 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 o 1:10.

En determinadas realizaciones, la sangre entera se diluye en una solución fisiológica. En determinadas realizaciones, el diluyente es una solución fisiológica que contiene oncóticos adicionales y otros factores como se describe en los ejemplos x-y u otras soluciones conservantes de órganos tales como, por ejemplo, Perfadex™ (véase el Ej. 5 a continuación), STEEN™ (solución salina fisiológica no tóxica que comprende albúmina sérica humana y dextrano 40, o una solución como se describe en la patente de los EE.UU. N.º 8.980.541) solución Euro Collins (véase el Ej. 5 a continuación), solución de almacenamiento en frío de la Universidad de Wisconsin (véase el Ej. 5 a continuación) o Celsior® solución (véase el Ej. 5 a continuación). En determinadas realizaciones, la solución fisiológica es solución STEEN™.

En algunas realizaciones, los factores oncóticos que se contempla usar para regular la presión osmótica de la solución fisiológica comprenden albúmina sérica, globulina o fibrinógeno. En algunas realizaciones, el factor oncótico comprende albúmina sérica. En algunas realizaciones, puede usarse gelatina para regular la presión oncótica de la solución.

Una solución fisiológica puede comprender además uno o más nutrientes (por ejemplo, aminoácido, monosacárido (por ejemplo, D-glucosa), vitamina, ion inorgánico, oligoelemento y/o sal) y/o factores de crecimiento, por ejemplo, a concentraciones fisiológicas, para soportar la supervivencia, proliferación y/o diferenciación de las células. En algunas realizaciones, el nutriente comprende uno o más de un azúcar, un aminoácido o una vitamina. En algunas realizaciones, el azúcar es D-glucosa.

En algunas realizaciones, la solución fisiológica comprende una sal inorgánica y un sistema tampón. En algunas realizaciones, el sistema tampón comprende un sistema tampón independiente de CO₂. En algunas realizaciones, el sistema tampón independiente de CO₂ comprende un sistema tampón de fosfato. La solución fisiológica puede contener cualquiera de los agentes adicionales que han de añadirse a la sangre entera o sangre entera diluida como se describe a continuación.

Agentes adicionales añadidos a muestras de sangre entera o sangre entera diluida

En algunas realizaciones, se añaden agentes adicionales descritos en el presente documento a la muestra de sangre entera o a la suspensión de sangre entera o a la muestra de sangre entera diluida antes o durante el contacto del armazón tubular acelular con la sangre entera. Como se ha explicado anteriormente, siempre que la adición de los factores descritos en el presente documento no diluya la sangre entera más del 5 o al menos no más del 10 %, la muestra de sangre entera todavía se considera sin diluir. Si la muestra de sangre entera se diluye más del 15 % con los factores descritos en el presente documento, entonces la muestra de sangre entera está diluida.

En determinadas realizaciones, la suspensión con sangre entera o sangre entera diluida o la sangre entera sin diluir comprende además un agente antitrombótico. En determinadas realizaciones, se introduce o se ha introducido un agente antitrombótico en la sangre entera antes de poner en contacto el armazón tubular acelular. En determinadas realizaciones, el agente antitrombótico comprende un agente anticoagulante. En determinadas realizaciones, el agente anticoagulante comprende heparina, un dextrano. En determinadas realizaciones, el agente antitrombótico comprende un inhibidor plaquetario tal como ácido ascórbico.

En determinadas realizaciones, el agente anticoagulante comprende heparina. En la técnica se conocen concentraciones eficaces de heparina para prevenir la coagulación. En algunas realizaciones, la heparina está presente en la muestra de sangre entera sin diluir o la suspensión que comprende la muestra de sangre entera a una concentración de aproximadamente 0,5 UI/ml a aproximadamente 150 UI/ml al comienzo del contacto con la superficie del armazón tubular acelular. En determinadas realizaciones, la concentración de heparina al comienzo del contacto es de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 UI/ml. En determinadas realizaciones, la concentración de heparina al comienzo del contacto es de aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 15 o aproximadamente 20 UI/ml. En determinadas realizaciones, la concentración de heparina al comienzo del contacto es de aproximadamente 6,7 UI/ml. En algunas realizaciones, el biorreactor con tubería y vena se prelava abundantemente con una solución de 50 UI/ml de heparina en PBS (por ejemplo, durante 1 hora), después se vacía y se llena con solución de sangre; y en diversas realizaciones, se obtiene una dilución 1:10 mediante la conmutación de soluciones, dando como resultado aproximadamente 5 UI/ml de heparina en la solución de sangre. En determinadas realizaciones, se usan vacutainers que contienen 17 UI de heparina/ml de sangre entera, dando como resultado aproximadamente 8,5 UI de heparina en la solución de sangre.

En determinadas realizaciones, el agente anticoagulante comprende un dextrano. Puede usarse dextrano de cualquier peso molecular promedio. En determinadas realizaciones, el dextrano tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 40 kD, es decir, el dextrano es dextrano-40. En determinadas realizaciones, el dextrano tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 60 kD, es decir, el dextrano es dextrano-60. En determinadas realizaciones, el dextrano tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 70 kD, es decir, el dextrano es dextrano-70. En determinadas realizaciones, la concentración del dextrano al comienzo del contacto es de aproximadamente 1 a aproximadamente 55 g/l. En determinadas realizaciones, la concentración del dextrano al

comienzo del contacto es de aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 4,5, aproximadamente 5, aproximadamente 10 o aproximadamente 20 g/l. En determinadas realizaciones, la concentración del dextrano al comienzo del contacto es de aproximadamente 5 g/l.

- 5 En determinadas realizaciones, el agente antitrombótico comprende ácido ascórbico. En determinadas realizaciones, la concentración de ácido ascórbico al comienzo del contacto es de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 200 µg/ml. En determinadas realizaciones, la concentración de ácido ascórbico al comienzo del contacto es de aproximadamente 1, aproximadamente 5, aproximadamente 10, aproximadamente 20, aproximadamente 50 o aproximadamente 100 µg/ml. En determinadas realizaciones, la concentración de ácido ascórbico al comienzo del
10 contacto es de aproximadamente 5 µg/ml.

En la presente invención pueden combinarse dos o más agentes antitrombóticos (por ejemplo, agentes anticoagulantes). En determinadas realizaciones, la suspensión comprende dos o más de los agentes seleccionados del grupo que consiste en heparina, dextrano (por ejemplo, dextrano-40) y ácido ascórbico. En determinadas
15 realizaciones, la suspensión comprende heparina, dextrano (por ejemplo, dextrano-40) y ácido ascórbico. El experto en la materia apreciaría que cuando se combinan dos o más agentes antitrombóticos, al menos uno de ellos puede usarse a una concentración más baja que la concentración a la que se usaría solo. En determinadas realizaciones, la suspensión comprende aproximadamente 6,7 UI/ml de heparina, aproximadamente 6,7 mg/ml de dextrano-40 y aproximadamente 4,5 µg/ml de ácido ascórbico. En determinadas realizaciones, la suspensión comprendía al menos
20 aproximadamente 6,7 UI/ml de heparina, aproximadamente 6,7 mg/ml de dextrano-40 y aproximadamente 4,5 µg/ml de ácido ascórbico.

En determinadas realizaciones, la suspensión con sangre entera o sangre entera diluida o la sangre entera sin diluir comprende además un factor de crecimiento seleccionado del grupo que consiste en: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), interleucina (IL)-3, IL-4, neutrofina (NT)-6, pleiotrofina (HB-GAM), midcina (MK), proteína-10 inducible por interferón (IP-10), factor plaquetario (FP)-4, proteína-1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1), RANTES (CCL-5, ligando 5 de quimiocina (motivo C-C), IL-8, IGF, factor de crecimiento fibroblástico (FGF)-1, FGF-2, FGF-3, FGF-4, FGF-5, FGF-6, FGF-7, FGF-8, FGF-9, factor de crecimiento transformante (TGF)-β, VEGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)-A, PDGF-B, HB-EGF, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF),
30 factor de necrosis tumoral (TNF)-α, factor de crecimiento (IGF)-1 similar a la insulina y cualquier combinación o combinaciones de los mismos. En determinadas realizaciones, el factor de crecimiento es un factor de crecimiento humano. En determinadas realizaciones, la concentración del factor de crecimiento es igual al nivel fisiológico promedio de la población del factor de crecimiento. En determinadas realizaciones, la concentración del factor de crecimiento es superior al nivel fisiológico promedio de la población del factor de crecimiento. En determinadas
35 realizaciones, el factor de crecimiento se complementa como una proteína recombinante.

En determinadas realizaciones, el factor de crecimiento es un factor de crecimiento fibroblástico (FGF)-2. En determinadas realizaciones, el FGF-2 es FGF-2 humano. En determinadas realizaciones, la concentración del FGF-2 al comienzo del contacto es de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 200 ng/ml. En determinadas realizaciones, la concentración del FGF-2 al comienzo del contacto es de aproximadamente 10 ng/ml. En determinadas
40 realizaciones, el FGF-2 se complementa antes del contacto a la concentración de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 200 ng/ml (por ejemplo, aproximadamente 10 ng/ml). En determinadas realizaciones, el FGF-2 es FGF-2 humano recombinante (rhFGF-2). En determinadas realizaciones, la concentración del rhFGF-2 al comienzo del contacto es de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 200 ng/ml (por ejemplo, aproximadamente 10 ng/ml).
45

En determinadas realizaciones, el factor de crecimiento es un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). En determinadas realizaciones, el VEGF es VEGF humano. En determinadas realizaciones, la concentración del VEGF al comienzo del contacto es de aproximadamente 4 a aproximadamente 800 ng/ml. En determinadas realizaciones, la concentración del VEGF al comienzo del contacto es de aproximadamente 80 ng/ml. En determinadas realizaciones, el VEGF se complementa antes del contacto a la concentración de aproximadamente 4 a aproximadamente 800 ng/ml (por ejemplo, aproximadamente 80 ng/ml). En determinadas realizaciones, el VEGF es VEGF humano recombinante (rhVEGF). En determinadas realizaciones, la concentración del rhVEGF al comienzo del contacto es de aproximadamente 4 a aproximadamente 800 ng/ml (por ejemplo, aproximadamente 80 ng/ml).
50

En determinadas realizaciones, la suspensión con sangre entera o sangre entera diluida o la sangre entera sin diluir comprende además ácido acetilsalicílico. En determinadas realizaciones, la concentración de ácido acetilsalicílico al comienzo del contacto es de entre 0,2 µg/ml y 200 µg/ml; o 0,5 µg/ml y 100 µg/ml; o 0,1 µg/ml y 50 µg/ml; o 1 µg/ml y 25 µg/ml; o 1 µg/ml y 10 µg/ml; o 2 µg/ml y 10 µg/ml; o 3 µg/ml y 8 µg/ml; o 4 µg/ml y 6 µg/ml. En determinadas realizaciones, la concentración de ácido acetilsalicílico al comienzo del contacto es de aproximadamente 0,5 µg/ml; o aproximadamente 1 µg/ml; o aproximadamente 2 µg/ml; o aproximadamente 3 µg/ml; o aproximadamente 4 µg/ml; o aproximadamente 5 µg/ml; o aproximadamente 6 µg/ml; o aproximadamente 7 µg/ml; o aproximadamente 8 µg/ml; o aproximadamente 8 µg/ml; o aproximadamente 9 µg/ml; o aproximadamente 10 µg/ml; o aproximadamente 25 µg/ml o aproximadamente 50 µg/ml; o aproximadamente 100 µg/ml; o aproximadamente 200 µg/ml. En determinadas realizaciones, la concentración de ácido acetilsalicílico al comienzo del contacto es de aproximadamente 5 µg/ml. En determinadas realizaciones, el VEGF se complementa antes del contacto a una concentración de entre 4 ng/ml y 800 ng/ml; o entre 10 ng/ml y 400 ng/ml; o entre 20 ng/ml y 200 ng/ml; o entre
55
60
65

40 ng/ml y 200 ng/ml; o entre 60 ng/ml y 100 ng/ml; o entre 70 ng/ml y 90 ng/ml.

En determinadas realizaciones, la concentración de albúmina sérica humana (HSA) al comienzo del contacto es de entre 50 mg/ml y 150 mg/ml; o entre 50 mg/ml y 125 mg/ml; o entre 50 mg/ml y 100 mg/ml; o entre 60 mg/ml y 90 mg/ml; o entre 60 mg/ml y 80 mg/ml; o entre 65 mg/ml y 75 mg/ml. En determinadas realizaciones, la concentración de albúmina sérica humana al comienzo del contacto es de aproximadamente 55 a aproximadamente 105 mg/ml, que es la cantidad cuando la sangre entera se diluye en una solución 2 veces. En determinadas realizaciones, la concentración de albúmina sérica humana al comienzo del contacto es de aproximadamente 45 a aproximadamente 69 mg/ml. En determinadas realizaciones, la concentración de HSA en una solución es de aproximadamente 70 mg/ml, y la concentración de HSA en sangre humana es de aproximadamente 45 mg/ml, y la sangre entera se diluye en la solución, la HSA en la suspensión que comprende sangre entera es de 55-60 mg/ml (es decir, dilución 2 veces de sangre entera en la solución). En determinadas realizaciones, la concentración de albúmina sérica humana después de diluir sangre entera en una solución que comprende HSA diluida 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 11 veces, 12 veces, 13 veces, 14 veces, 15 veces, 16 veces, 17 veces, 18 veces, 19 o 20 veces.

En determinadas realizaciones, la suspensión con sangre entera o sangre entera diluida o la sangre entera sin diluir comprende uno o más nutrientes y/o factores de crecimiento, por ejemplo, a concentraciones fisiológicas, para soportar la supervivencia, proliferación y/o diferenciación de las células. En determinadas realizaciones, los nutrientes se seleccionan del grupo que consiste en monosacáridos (por ejemplo, D-glucosa), aminoácidos (aminoácidos naturales), vitaminas, iones inorgánicos, oligoelementos, sales y cualquier combinación de los mismos. En determinadas realizaciones, el aminoácido incluido como nutriente puede ser uno o más de: L-argininaHCl, L-cistina2HCl, L-cistinaHCl H₂O, L-histidinaHCl H₂O, L-isoleucina, L-leucina, L-lisinaHCl, L-metionina, L-fenilalanina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina2H₂O, L-valina, L-alanina, L-asparragina, ácido L-aspártico, ácido L-glutámico, glicina, L-prolina, L-serina y/o L-hidroxiprolina. En determinadas realizaciones, la vitamina incluida como nutriente puede ser una o más de: K-Ca-pantotenato, cloruro de colina, ácido fólico, i-inositol, niacinamida, HCl de piridoxal, HCl de piridoxina, riboflavina, HCl de tiamina, biotina, vitamina B12, ácido para-aminobenzoico, niacina, ácido ascórbico, fosfato de atocoferol, calciferol, menadiona, Vitamina A. En determinadas realizaciones, el ion inorgánico se incluye en forma de una sal inorgánica que incluye, pero sin limitación, CaCl₂, KCl, MgSO₄, NaCl, NaHCO₃, NaHPO₄, KNO₃, NaSeO₃, Ca(NO₃)₂, CuSO₄, NaHPO₄, MgCl₂, Fe(NO₃)₃, CuSO₄, FeSO₄ y/o KH₂PO₄.

En algunas realizaciones, la suspensión con sangre entera o sangre entera diluida o la sangre entera sin diluir comprende de aproximadamente el 0,7 % a aproximadamente el 1,5 % de sal. En algunas realizaciones, la solución fisiológica comprende aproximadamente el 0,7 %, aproximadamente el 0,8 %, aproximadamente el 0,9 % o aproximadamente el 1,0 % de sal.

En determinadas realizaciones, la suspensión comprende un sistema tampón independiente de CO₂. En algunas realizaciones, el sistema tampón independiente de CO₂ comprende un sistema tampón de fosfato. En algunas realizaciones, el sistema tampón independiente de CO₂ comprende un tampón de fosfato y bicarbonato de sodio. En determinadas realizaciones, la suspensión comprende además uno o más de: D-glucosa, rojo de fenol, HEPES, piruvato de sodio, glutatión (reducido), hipoxantina.Na, timidina, ácido lipoico, putrescina 2HCl, bacto-peptona, timina, sulfato de adenina, adenosina-5-trifosfato, colesterol, 2-desoxi-D-ribosa, adenosina-5-fosfato, HCl de guanina, ribosa, acetato de sodio, Tween 80, uracilo y/o xantina Na.

En determinadas realizaciones, un factor no celular de la suspensión de sangre entera promueve la celularización del armazón tubular acelular, por ejemplo, promoviendo la supervivencia, la proliferación y/o la diferenciación celulares. En determinadas realizaciones, el factor no celular es un componente no celular presente en la sangre entera. En determinadas realizaciones, el factor sanguíneo no celular es un factor generado a partir de la sangre entera (por ejemplo, a partir de las células en la sangre entera) durante el contacto. En determinadas realizaciones, el factor sanguíneo no celular promueve la compatibilidad del hospedador, la celularización o la integración del vaso tras el injerto. En la siguiente tabla se proporcionan ejemplos no limitantes de factores no celulares de la presente invención:

Factores no celulares
Subunidad delta de hemoglobina
Subunidad épsilon de hemoglobina
Plasminógeno
Subunidad alfa de hemoglobina
Subunidad gamma-1 de hemoglobina
Albúmina sérica
Alfa-2-macroglobulina
Subunidad B del subcomponente C1q del complemento
Subunidad beta de hemoglobina
Tromboespondina-1
Isoenzima 1 de adenilato cinasa
Cadena alfa de fibrinógeno
Flavina reductasa (NADPH)
Complemento C3
Factor de von Willebrand
Cadena beta de fibrinógeno
Peroxirredoxina-2
Cadena pesada de inhibidor de inter-alfa-tripsina H2
Subunidad alfa de hemoglobina
Inmunoglobulina kappa variable 2-30
Apolipoproteína B-100
Miembro 3 de la familia Fermitina
Ceruloplasmina
Fosfoinosítido fosfolipasa C
Cadena beta de fibrinógeno
Isoforma 2 del homólogo 3 de la familia Fermitina
Alfa-2-macroglobulina
Isoforma 2 de la cadena alfa de Espectrina, Eritrocítico 1
Proteína S100-A8
ClqB del complemento (Fragmento)
Fibulina-1
Paraoxonasa sérica/arilesterasa 1
Hemopexina
Cadena alfa de fibrinógeno
Subunidad beta de hemoglobina
Complemento C4-B
Complemento C4-A
Isoforma Er16 de Ankirina-1
Catalasa
Complemento C3
GC, proteína de unión a vitamina D
Albúmina sérica
Albúmina sérica
Fructosa-bifosfato aldolasa A

(continuación)

Proteína del factor X de coagulación
Cadena pesada de inhibidor de inter-alfa-tripsina H2
Proteína S dependiente de vitamina K
5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido formiltransferasa/IMP ciclohidrolasa
Profilina
Peroxirredoxina 2
Componente 4A del complemento
Factor de von Willebrand
Componente C7 del complemento
Profilina-1
Isoforma 3 de la Fibronectina
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
Ceruloplasmina
Fructosa-bifosfato aldolasa
Isoforma 3 de la proteína 1 de unión al factor de crecimiento transformante latente beta
Isoforma 2 de la cadena de Tropomiosina alfa-1
Catalasa
Proteína 1 de unión a selenio
Cadena de tropomiosina alfa-1
Tromboespondina-3
Peroxirredoxina-1
Tirosina-proteína cinasa
Antitrombina-III
Proteína nuclear de unión a GTP Ran
Peroxirredoxina-6
Proteína del canal intracelular de cloruro
Anafilatoxina C5a del complemento
Isoforma 4 de la cadena de Tropomiosina alfa-3
Cadena de tropomiosina alfa-4
Proteína arginina N-metiltransferasa 5
Componente C7 del complemento
Proteína 1 del canal intracelular de cloruro
Carbonil reductasa 3
SPARC
Isoforma 2 de ubiquitina carboxilo-terminal hidrolasa 14
Vinculina o Isoforma 1 de Vinculina
C-1-tetrahidrofolato sintasa, citoplasmática
Metilentetrahidrofolato deshidrogenasa (dependiente de NADP+) 1
Tirosina-proteína cinasa
Cofactor de heparina 2
SPARC
Isoforma 2 del factor de coagulación IX
Proteína Rab-30 relacionada con Ras
Serina/treonina-proteína cinasa OSR1

(continuación)

Protooncogén B similar a RAS
Isoforma 2 de la proteína 1 asociada a adenilil ciclasa
Proteína 1 de dominio PDZ y LIM
Factor de coagulación IX (Fragmento)
Talina-1
Fibulina-1 OS = Sus scrofa
Isoforma beta de la subunidad A reguladora de 65 kDa de serina/treonina proteína fosfatasa 2A (Fragmento)
Isoforma 2 de la cadena pesada H3 del inhibidor de inter-alfa-tripsina
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Fragmento)
Glutación peroxidasa 3
UMP-CMP cinasa
Cofilina-1
Peptidil-prolil cis-trans isomerasa A
Cadena del factor de coagulación XIII A
Serina/treonina-proteína cinasa OSR1
RAB7A, miembro de la familia de oncogenes RAS
6-fosfofructocinasa
Superóxido dismutasa
Factor 6 de ADP-ribosilación
Alfa-proteína de unión NSF soluble
Factor de inicio eucariota 4A-III
Piruvato cinasa PKM
Factor de inicio de la traducción eucariota 5A-1
Gelsolina
Proteína Rab-14 relacionada con Ras
Proteína asociada a adenilil ciclasa
Proteína asociada a adenilil ciclasa
Piruvato cinasa
Gelsolina (Fragmento)
Piruvato cinasa
Peroxisredoxina-6
Isoforma 3 de la proteína Rap-1b relacionada con Ras
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
Proteína Rab-6B relacionada con Ras
Subunidad reguladora 6A del proteasoma 26S
6-Fosfofructocinasa dependiente de ATP, tipo hepático
Subunidad beta del complejo AP
ATPasa del retículo endoplásmico de transición
Proteína Rap-1A relacionada con Ras
Factor derivado del epitelio pigmentario
Subunidad zeta de la proteína 1 del complejo T
Subunidad delta de la proteína 1 del complejo T

Uno cualquiera de los agentes desvelados anteriormente, por ejemplo, agentes antitrombóticos, nutrientes, diluyente y sistema tampón independiente de CO₂, puede introducirse en el diluyente (por ejemplo, la solución fisiológica) y mezclarse en la suspensión tras la dilución de la sangre entera. Como alternativa o adicionalmente, puede introducirse

directamente en la sangre entera antes de la dilución y/o introducirse en la suspensión después de la dilución de la sangre entera.

En determinadas realizaciones, la concentración de un nutriente en la suspensión se controla y se ajusta de forma continua o de forma regular. En determinadas realizaciones, el nutriente se selecciona del grupo que consiste en un monosacárido (por ejemplo, D-glucosa), un aminoácido (por ejemplo, un aminoácido natural), una vitamina, un ion inorgánico, un oligoelemento y una sal. En una realización específica, la concentración de D-glucosa en la suspensión se controla durante el contacto, y se añade D-glucosa a la suspensión para mantener la concentración de D-glucosa a aproximadamente 3 a aproximadamente 11 mmol/l.

En determinadas realizaciones, la concentración de D-glucosa en la suspensión se controla midiendo la concentración de D-glucosa en una muestra recogida de la suspensión. En determinadas realizaciones, la concentración de D-glucosa en la suspensión se mide de forma regular, tal como dos veces al día, una vez al día o una vez cada dos días. En determinadas realizaciones, la concentración de D-glucosa en la suspensión se controla midiendo la concentración de D-glucosa usando un sensor que está en contacto con la suspensión. En determinadas realizaciones, el sensor está en contacto de forma continua con la suspensión durante el contacto. En determinadas realizaciones, se añade D-glucosa cuando la concentración medida de D-glucosa en la suspensión es inferior a 4 mmol/l. En determinadas realizaciones, se añade D-glucosa para alcanzar una concentración final de aproximadamente 7 mmol/l; aproximadamente 8 mmol/l; aproximadamente 9 mmol/l; o aproximadamente 10 mmol/l de D-glucosa en la suspensión. En algunas realizaciones, los niveles de glucosa se ajustan mediante la adición de una solución madre de D-glucosa 1,1 M. En determinadas realizaciones, la adición de 0,91 µl de solución madre (a 1,1 M) por ml de solución de sangre conduce a un aumento de 1 mmol/l en el nivel de glucosa. El control continuo mediante un sensor, opcionalmente en combinación con la adición automática de D-glucosa en la suspensión, permite el mantenimiento de la concentración de D-glucosa en un intervalo más estrecho. En consecuencia, en determinadas realizaciones, la concentración de D-glucosa se mantiene a aproximadamente 5 a aproximadamente 8 mmol/l.

Factores sanguíneos no celulares

En algunas realizaciones, la muestra de sangre entera comprende uno o más factores no celulares, en donde uno o más factores no celulares de la sangre entera pueblan el armazón, y en donde los uno o más factores no celulares promueven la celularización del armazón tubular acelular y la compatibilidad del hospedador con el vaso tras el injerto. Como se usa en el presente documento, la expresión "factor no celular" se refiere a un componente en la suspensión de sangre entera que no comprende una célula eucariota completa. Un factor no celular puede ser cualquier tipo de molécula, incluyendo, pero sin limitación, proteína, ácido nucleico, sacárido, lípido, molécula pequeña, ión de metal o un conjugado o combinación de los mismos.

Por ejemplo, el factor no celular puede ser factores de crecimiento. En algunas realizaciones, el factor de crecimiento se selecciona del grupo que consiste en: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), interleucina (IL)-3, IL-4, neutrofina (NT)-6, pleiotrofina (HB-GAM), midcina (MK), proteína-10 inducible por interferón (IP-10), factor plaquetario (FP)-4, proteína-1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1), RANTES (CCL-5, ligando 5 de quimiocina (motivo C-C), IL-8, IGF, factor de crecimiento fibroblástico (FGF)-1, FGF-2, FGF-3, FGF-4, FGF-5, FGF-6, FGF-7, FGF-8, FGF-9, factor de crecimiento transformante (TGF)-β, VEGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)-A, PDGF-B, HB-EGF, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de necrosis tumoral (TNF)-α, factor de crecimiento (IGF)-1 similar a la insulina y cualquier combinación o combinaciones de los mismos.

En determinadas realizaciones, el factor sanguíneo no celular es un fragmento celular (por ejemplo, trombocito, fracción celular). En determinadas realizaciones, el factor sanguíneo no celular es una proteína (por ejemplo, citocina, quimiocina, factor de crecimiento, anticuerpo, fragmento de anticuerpo, proteína del sistema del complemento o enzima). En determinadas realizaciones, el factor sanguíneo no celular es un ácido nucleico (por ejemplo, ADN circulante, ARN circulante o miARN circulante). En determinadas realizaciones, el factor sanguíneo no celular es un sacárido (por ejemplo, monosacárido o disacárido). En determinadas realizaciones, el factor sanguíneo no celular es un lípido (por ejemplo, ácido graso, triglicérido o colesterol). En determinadas realizaciones, el factor sanguíneo no celular es una molécula pequeña. En determinadas realizaciones, el factor sanguíneo no celular es un ion de metal.

En determinadas realizaciones, el factor sanguíneo no celular es una forma modificada o un metabolito de una cualquiera de las moléculas anteriores. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el factor sanguíneo no celular es un segmento de una proteína (por ejemplo, un péptido o polipéptido). En determinadas realizaciones, el factor sanguíneo no celular es un ácido nucleico con una o más modificaciones (por ejemplo, metilación, protección con capuchón en 5'). En determinadas realizaciones, el factor sanguíneo no celular es un ácido aldónico o aldito de un sacárido. En determinadas realizaciones, el factor sanguíneo no celular es un esteroide. En determinadas realizaciones, el factor sanguíneo no celular es un conjugado de una cualquiera de las moléculas desveladas en el presente documento, en donde las moléculas se conjugan de forma covalente o de forma no covalente.

En determinadas realizaciones, la concentración del factor de crecimiento es igual al nivel fisiológico promedio de la población del factor de crecimiento. En determinadas realizaciones, la concentración del factor de crecimiento es superior al nivel fisiológico promedio de la población del factor de crecimiento. En determinadas realizaciones, el factor

de crecimiento se complementa como una molécula aislada, purificada y/o sintética.

El factor sanguíneo no celular puede contribuir al reacondicionamiento/recelularización del almacén tubular acelular de diversas maneras *in vitro* o después de la implantación. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el factor sanguíneo no celular promueve la fijación o adherencia de las células al almacén. En determinadas realizaciones, el factor sanguíneo no celular promueve la proliferación de células progenitoras. En determinadas realizaciones, el factor sanguíneo no celular promueve la diferenciación de células progenitoras en células que pueden poblar el almacén. En determinadas realizaciones, el factor sanguíneo no celular inhibe la apoptosis y/o necrosis de las células y/o células progenitoras. En determinadas realizaciones, el factor sanguíneo no celular promueve la retirada o el enmascaramiento de la proteína o proteínas alógenas presentes en el almacén. En determinadas realizaciones, el factor sanguíneo no celular promueve el depósito de proteína o proteínas autólogas en el almacén. En determinadas realizaciones, el factor sanguíneo no celular promueve el acondicionamiento del almacén para suprimir el rechazo del hospedador.

Contacto del almacén tubular acelular con sangre entera del paciente

La presente divulgación proporciona un método de preparación de un vaso sanguíneo personalizado, comprendiendo el método poner en contacto la superficie (por ejemplo, superficie interna) de un almacén tubular acelular (por ejemplo, un vaso sanguíneo descelularizado o un almacén tubular bioimpreso) con una suspensión que comprende sangre entera durante más de 48 horas, permitiendo de este modo que las células presentes en la sangre pueblen el almacén. En algunas realizaciones, la superficie del almacén tubular acelular es la superficie interna del almacén tubular acelular.

Como se usa en el presente documento, el término "contacto", la expresión "poner en contacto", o el término "contactado" significan la incubación estática, la perfusión, la introducción, la inyección o el cultivo. La perfusión puede ser perfusión pulsada, perfusión en intervalos, dirección alterna y ninguna perfusión. En algunas realizaciones, el almacén tubular acelular se perfunde de forma continua con la suspensión o sangre entera.

En los métodos de la presente invención, el contacto se realiza durante 3 a 14 días. En otros casos desvelados, pero no necesariamente reivindicados, el contacto se realiza durante más de 2 días. Como se usa en el presente documento, la expresión "más de 2 días" se refiere a una duración que es superior a 48 horas y superior a aproximadamente 48 horas. Los términos "día" y "días" se refieren a uno o más ciclos de 24 horas. En determinados casos desvelados, pero no necesariamente reivindicados, el contacto es durante al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6 o al menos 7 días. En determinados casos desvelados, pero no necesariamente reivindicados, el contacto es durante hasta 9, hasta 10, hasta 11, hasta 12, hasta 13, hasta 14 días, hasta 21 días o hasta 31 días. En determinados casos desvelados, pero no necesariamente reivindicados, el contacto es durante hasta 1 mes. En algunos casos desvelados, pero no necesariamente reivindicados, el contacto es durante de aproximadamente 1 a 31 días, durante 2 a 21 días, durante 2 a 14 días, durante 2 a 9 días, durante 2 a 7 días, durante 2 a 5 días, durante 5 a 7 días o durante 7 a 9 días. En determinadas realizaciones, el contacto es durante aproximadamente 7 a aproximadamente 9 días. En algunos casos desvelados, pero no necesariamente reivindicados, el contacto con la superficie del almacén tubular acelular es durante 2 a 21 días, durante 3 a 21 días, durante 4 a 21 días, durante 5 a 21 días, durante 6 a 21 días o durante 7 a 21 días. En determinados casos desvelados, pero no necesariamente reivindicados, el contacto es durante aproximadamente 2 días, durante aproximadamente 3 días, durante aproximadamente 4 días, durante aproximadamente 5 días, durante aproximadamente 6 días, durante aproximadamente 7 días, durante aproximadamente 8 días, durante aproximadamente 9 días, durante aproximadamente 10 días, durante aproximadamente 11 días, durante aproximadamente 12 días, durante aproximadamente 13 días, durante aproximadamente 14 días, durante aproximadamente 15 días, durante aproximadamente 16 días, durante aproximadamente 17 días, durante aproximadamente 18 días, durante aproximadamente 19 días, durante aproximadamente 20 días o durante aproximadamente 21 días.

Los términos "día" y "días" se refieren a uno o más ciclos de 24 horas. En determinadas realizaciones, el contacto es durante al menos 4, al menos 5, al menos 6 o al menos 7 días. En determinadas realizaciones, el contacto es durante hasta 9, hasta 10, hasta 11, hasta 12 o hasta 13 días. En determinadas realizaciones, el contacto es durante aproximadamente 7 a aproximadamente 9 días. En determinadas realizaciones, el contacto es durante aproximadamente 3 días, durante aproximadamente 4 días, durante aproximadamente 5 días, durante aproximadamente 6 días, durante aproximadamente 7 días, durante aproximadamente 8 días, durante aproximadamente 9 días, durante aproximadamente 10 días, durante aproximadamente 11 días, durante aproximadamente 12 días, durante aproximadamente 13 días o durante aproximadamente 14 días.

El almacén tubular acelular (por ejemplo, un vaso sanguíneo descelularizado o un almacén tubular bioimpreso) puede ponerse en contacto con una muestra de sangre entera sin diluir o la suspensión que contiene sangre entera diluida de cualquier manera conocida en la técnica. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el almacén está suelto y suspendido en la suspensión, opcionalmente en donde la suspensión se agita (por ejemplo, rota) para volver a mezclar los componentes de forma regular o de forma continua. La rotación del almacén tubular durante la perfusión puede ser continua/intermitente, alterna o en intervalos.

En determinadas realizaciones, la superficie interna del armazón se pone en contacto con la suspensión. En determinadas realizaciones, el armazón se perfunde con la suspensión. En determinadas realizaciones, el armazón se perfunde con una recirculación cerrada de la suspensión. En determinadas realizaciones, el contacto continuo es perfusión realizada usando un biorreactor. En determinadas realizaciones, la superficie externa del armazón también está en contacto con la suspensión. En otras realizaciones, la superficie externa del armazón no está en contacto con la suspensión. En determinadas realizaciones, el contacto se realiza *in vitro*.

La perfusión puede realizarse en cualquier modo. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el armazón se perfunde con la suspensión de forma continua. En determinadas realizaciones, el armazón se perfunde con la suspensión de forma intermitente (por ejemplo, perfusión durante 1 minuto a un intervalo de 4 minutos). En determinadas realizaciones, la perfusión se realiza en una única dirección. En determinadas realizaciones, la dirección única es la dirección del flujo anterógrado, por ejemplo, la dirección permitida por la estructura o estructuras de la válvula en el armazón. En determinadas realizaciones, la perfusión se realiza en direcciones alternas (por ejemplo, cambiando de dirección cada 5 minutos). La velocidad de la perfusión puede ser determinada por el experto a la luz de una serie de factores, tales como el diámetro del armazón tubular, la resistencia mecánica del armazón, el tiempo que tardan las células en sedimentar y la viscosidad de la suspensión. En determinadas realizaciones, el armazón se perfunde a una velocidad de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50 ml por minuto. En determinadas realizaciones, el armazón se perfunde a una velocidad de aproximadamente 2 ml por minuto. Dependiendo de la orientación del armazón, la rotación durante la perfusión (incluyendo los intervalos) puede ser ventajosa de manera que la superficie interior del armazón se pueble de forma uniforme. En determinadas realizaciones, el armazón rota de forma continua. En determinadas realizaciones, el armazón rota de forma intermitente (por ejemplo, 30° cada 5 minutos). El sentido de la rotación puede ser constante o alterno. La ventaja de la rotación puede no ser sustancial cuando el armazón se fija verticalmente. En consecuencia, en determinadas realizaciones, el armazón no rota.

En realizaciones específicas, el armazón (por ejemplo, el lumen del armazón) se perfunde de forma continua con la suspensión. En determinadas realizaciones, el armazón se perfunde a una velocidad de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50 ml por minuto (por ejemplo, aproximadamente 2 ml por minuto). En determinadas realizaciones, el armazón se perfunde con una recirculación cerrada de la suspensión. En determinadas realizaciones, el contacto continuo es perfusión realizada usando un biorreactor.

Control de las condiciones ambientales durante el contacto

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método de preparación de un vaso sanguíneo personalizado, comprendiendo el método poner en contacto la superficie de un armazón tubular acelular (por ejemplo, un vaso sanguíneo descelularizado o un armazón tubular bioimpreso) con una suspensión que comprende sangre entera, en donde una pluralidad de parámetros ambientales (por ejemplo, la temperatura, el pH, el contenido de oxígeno y/o el contenido de CO₂) se controlan y se ajustan de forma continua o de forma regular.

En determinadas realizaciones, el contacto se realiza a aproximadamente 8 °C a aproximadamente 40 °C. En determinadas realizaciones, el contacto se realiza a aproximadamente 20 °C a aproximadamente 25 °C. En determinadas realizaciones, el contacto se realiza a aproximadamente 37 °C. En determinadas realizaciones, el contacto se realiza a aproximadamente 20 °C, aproximadamente 21 °C, aproximadamente 22 °C, aproximadamente 23 °C, aproximadamente 24 °C o aproximadamente 25 °C.

En determinadas realizaciones, el contacto se realiza a un pH de aproximadamente 7,2 a un pH de aproximadamente 7,5. En determinadas realizaciones, el contacto se realiza a un pH de aproximadamente 7,4.

En determinadas realizaciones, el contacto se realiza a aproximadamente 30 mmHg a aproximadamente 100 mmHg de presión parcial de oxígeno. En determinadas realizaciones, el contacto se realiza a aproximadamente 30 mmHg a aproximadamente 40 mmHg de presión parcial de oxígeno. En determinadas realizaciones, el contacto se realiza a aproximadamente 80 mmHg a 100 mmHg de presión parcial de oxígeno. En determinadas realizaciones, el contacto se realiza a aproximadamente 160 mmHg de presión parcial de oxígeno.

En determinadas realizaciones, el contacto se realiza a aproximadamente 38 mmHg a aproximadamente 76 mmHg de presión parcial de dióxido de carbono. En determinadas realizaciones, el contacto se realiza a aproximadamente 38 mmHg de presión parcial de dióxido de carbono. En determinadas realizaciones, el contacto se realiza a aproximadamente 76 mmHg de presión parcial de dióxido de carbono. En determinadas realizaciones, el contacto se realiza a aproximadamente 40 mmHg a aproximadamente 50 mmHg de presión parcial de dióxido de carbono.

En determinadas realizaciones, los parámetros ambientales (por ejemplo, la temperatura, pH, el contenido de oxígeno y/o el contenido de CO₂) se controlan y se ajustan de forma continua o de forma regular durante el contacto.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método de preparación de un vaso sanguíneo personalizado, comprendiendo el método poner en contacto la superficie de un armazón tubular acelular (por ejemplo, un vaso sanguíneo descelularizado o un armazón tubular bioimpreso) con una suspensión que comprende sangre entera, en donde la concentración de un nutriente en la suspensión se controla y se ajusta de forma continua o de forma regular.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método de preparación de un vaso sanguíneo personalizado, comprendiendo el método poner en contacto la superficie de un almacén tubular acelular (por ejemplo, un vaso sanguíneo descelularizado o un almacén tubular bioimpreso) con una suspensión que comprende sangre entera, en donde la concentración de D-glucosa en la suspensión se controla durante el contacto, y se añade D-glucosa a la suspensión para mantener la concentración de D-glucosa a aproximadamente 3 a aproximadamente 11 mmol/l.

En algunas realizaciones, la concentración de D-glucosa en la suspensión se controla midiendo la concentración de D-glucosa en una muestra recogida de la suspensión. En algunas realizaciones, la concentración de D-glucosa en la suspensión se mide una vez al día. En algunas realizaciones, la concentración de D-glucosa en la suspensión se controla midiendo la concentración de D-glucosa usando un sensor que está en contacto con la suspensión. En algunas realizaciones, el sensor está en contacto de forma continua con la suspensión durante el contacto.

En algunas realizaciones, se añade D-glucosa cuando la concentración medida de D-glucosa en la suspensión es inferior a 4 mmol/l. En algunas realizaciones, se añade D-glucosa para alcanzar una concentración final de 10 mmol/l de D-glucosa en la suspensión.

Preparación de almacén tubular acelular con un componente enriquecido o seleccionado de sangre entera

En determinadas realizaciones, la presente divulgación proporciona un método de preparación de un vaso sanguíneo personalizado en el que se enriquece y selecciona uno o más componentes de sangre entera y después se añaden a la superficie de un almacén tubular acelular para que entren en contacto con la superficie interna del almacén. Por ejemplo, un componente seleccionado de trombocitos, células nucleadas, proteínas, factores de crecimiento, factores de señalización, inmunoglobulinas y cualquier combinación o combinaciones de los mismos, puede añadirse a la superficie interna de un almacén tubular acelular. El componente puede enriquecerse o seleccionarse mediante, por ejemplo, centrifugación, centrifugación en gradiente, separación mediante adhesión selectiva, filtración o clasificación (por ejemplo, FACS, MACS).

Los términos "enriquecido y seleccionado" se refieren a una sustancia y/o entidad que se ha separado de al menos uno de los componentes con los que se mezcló cuando se produjo inicialmente (ya sea en la naturaleza o en un entorno experimental). En determinadas realizaciones, una sustancia y/o entidad aislada se separa de al menos el 10 %, al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 99 % exenta de los componentes con los que se mezcló cuando se produjo inicialmente. En determinadas realizaciones, se purifica una sustancia y/o entidad enriquecida y seleccionada. En determinadas realizaciones, una sustancia y/o entidad enriquecida, seleccionada y/o purificada está sustancialmente exenta de otros componentes. Como se usa en el presente documento, el cálculo del porcentaje de separación o pureza no incluye excipientes (por ejemplo, tampón, disolvente, agua, etc.).

Vasos sanguíneos personalizados

El método desvelado en el presente documento permite que las células y/o las células progenitoras pueblen la superficie (por ejemplo, superficie interna) del almacén tubular acelular (por ejemplo, un vaso sanguíneo descelularizado o un almacén tubular bioimpreso), generando de este modo el vaso sanguíneo personalizado. En determinadas realizaciones, las células comprenden células endoteliales. En determinadas realizaciones, las células comprenden células de músculo liso. En determinadas realizaciones, las células progenitoras comprenden células progenitoras endoteliales. En determinadas realizaciones, las células progenitoras comprenden células progenitoras de músculo liso. El experto en la materia entendería que las células y/o las células progenitoras podrían poblar el almacén de una o más maneras. La población del almacén puede ocurrir *in vitro* antes de la implantación o *in vivo* después de la implantación. En determinadas realizaciones, las células se unen al almacén. En determinadas realizaciones, las células progenitoras proliferan y/o se diferencian para generar células descendientes, y las células descendientes se unen al almacén.

En determinadas realizaciones, el contacto da como resultado la proliferación y/o diferenciación de las células progenitoras en células endoteliales. En determinadas realizaciones, las células endoteliales expresan cadherina VE, AcLDL, vWF y/o CD31. El almacén reacondicionado/recelularizado puede caracterizarse por la presencia de células endoteliales y de músculo liso. Se usan técnicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia bien conocidas por los expertos en la materia para detectar la presencia o ausencia de células endoteliales y de músculo liso. Para visualizar la presencia de células endoteliales, pueden usarse anticuerpos contra CD31 (1:200) (Abcam, Alemania) y vWF (1:100) (Santa Cruz, Alemania) para la tinción de los almacenes reacondicionados/recelularizados. Para visualizar las células del músculo liso, puede usarse anticuerpo contra la actina del músculo liso (1:50) (Abcam, Alemania) para teñir las válvulas reacondicionadas/recelularizadas. La presencia de células positivas de estos marcadores en los almacenes recolularizados se detecta mediante inmunohistoquímica o inmunofluorescencia. Las células musculares lisas también pueden identificarse por la morfología de las células musculares fusiformes que revisten los almacenes reacondicionados/recelularizados.

Los vasos sanguíneos personalizados preparados mediante el método desvelado en el presente documento son útiles

para la implantación en un sujeto (por ejemplo, humano). En determinadas realizaciones, el vaso sanguíneo personalizado es útil como vena. En determinadas realizaciones, el método comprende además una etapa de evaluación de la función de la válvula venosa (por ejemplo, usando un ensayo de competencia de la válvula *in vitro*) del vaso sanguíneo personalizado. Se proporcionan ensayos de competencia de la válvula *in vitro* en la publicación de patente de los EE.UU. N.º 2017/0071738. En determinadas realizaciones, la función de la válvula venosa se somete a ensayo antes del reacondicionamiento/recelularización. En determinadas realizaciones, la función de la válvula venosa se somete a ensayo después del reacondicionamiento/recelularización. En determinadas realizaciones, la función de la válvula venosa se somete a ensayo tanto antes como después del reacondicionamiento/recelularización.

Un vaso sanguíneo funcional personalizado no tiene fugas. En consecuencia, en determinadas realizaciones, el método comprende además una etapa de evaluación de fugas. En la técnica se conocen diversos métodos para someter a ensayo las fugas. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el vaso sanguíneo personalizado se lava con una solución (por ejemplo, una solución tamponada fisiológicamente tal como solución salina tamponada con fosfato (PBS)), preferentemente a una velocidad constante, y se observa la superficie del vaso sanguíneo personalizado en busca de acumulación de solución resultante de una fuga o un agujero. En determinadas realizaciones, la fuga se somete a ensayo antes del reacondicionamiento/recelularización. En determinadas realizaciones, la fuga se somete a ensayo después del reacondicionamiento/recelularización. En determinadas realizaciones, las fugas se someten a ensayo tanto antes como después del reacondicionamiento/recelularización.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un vaso sanguíneo personalizado preparado mediante cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento. En determinadas realizaciones, el vaso sanguíneo personalizado comprende un armazón tubular acelular (por ejemplo, un vaso sanguíneo descelularizado, opcionalmente tratado con MMP, o un armazón tubular bioimpreso) que incluye factores no celulares tales como componentes de MEC/composición de un vaso sanguíneo de mamífero o una parte funcional del mismo, celularizado con células humanas (por ejemplo, células endoteliales y/o células de músculo liso).

El vaso sanguíneo personalizado de la presente divulgación comprende además células tales como, pero sin limitación, células madre derivadas de sangre entera o células progenitoras tales como células madre endoteliales, células progenitoras endoteliales, células progenitoras de músculo liso, sangre entera, sangre periférica y cualquier población celular que pueda aislarse de sangre entera. Las células progenitoras se definen como células que se comprometen a diferenciarse en un tipo de células. Por ejemplo, células progenitoras endoteliales significan células que están programadas para diferenciarse en células endoteliales; células progenitoras de músculo liso significa células que están programadas para diferenciarse en células de músculo liso. Las células progenitoras en sangre entera o sangre periférica incluyen la población de células no comprometidas y/o comprometidas, tales como células pluripotentes o células totipotentes.

En determinadas realizaciones, la superficie del vaso sanguíneo personalizado está sustancialmente cubierta por células. En determinadas realizaciones, la superficie interna del vaso sanguíneo personalizado está sustancialmente cubierta por células endoteliales. En determinadas realizaciones, las células endoteliales expresan cadherina VE, AcLDL, vWF y/o CD31.

El experto en la materia apreciaría que las células y/o las células progenitoras en la sangre no necesitan poblar la superficie interna del armazón en la medida en que el armazón reacondicionado/recelularizado no se pueda distinguir de los vasos sanguíneos nativos. Como se desvela en el presente documento, puede producirse recelularización *in vitro* así como post-implantación *in vivo*, y un armazón parcialmente recelularizado *in vitro* puede recelularizarse adicionalmente *in vivo* para recuperar la morfología y/o función de los vasos sanguíneos nativos. Entendiendo esto, las células endoteliales con una densidad más baja que en los vasos sanguíneos nativos también pueden cubrir sustancialmente la superficie interna del armazón al adoptar una morfología más extendida, uniéndose de este modo a un área de superficie más grande por célula.

Los vasos sanguíneos personalizados preparados mediante el método desvelado en el presente documento son útiles para la implantación en un sujeto (por ejemplo, humano). En determinadas realizaciones, el vaso sanguíneo personalizado es útil como vena.

En determinadas realizaciones, el armazón tubular acelular deriva de una vena (por ejemplo, se prepara mediante la descelularización de una vena nativa). En determinadas realizaciones, la vena está en una extremidad inferior. El sistema venoso de las extremidades inferiores incluye las venas profundas, que se encuentran debajo de la fascia muscular y drenan los músculos de las extremidades inferiores; las venas superficiales, que están por encima de la fascia profunda y drenan la microcirculación cutánea; y las venas perforantes que penetran la fascia muscular y conectan las venas superficiales y profundas. Las venas comunicantes conectan las venas dentro del mismo compartimento.

En determinadas realizaciones, la vena es una vena profunda. Las venas profundas útiles para los métodos de la presente invención incluyen, pero sin limitación, la vena femoral superficial, que conecta la vena poplítea con la vena femoral común y las venas profundas de la pantorrilla (por ejemplo, venas tibial anterior, tibial posterior y peronea). En determinadas realizaciones, la vena es una vena superficial. Las venas profundas útiles para los métodos instantáneos

incluyen, pero sin limitación, la vena safena mayor, las venas safenas mayores accesorias anterior y posterior, la vena safena menor (VSM) y la vena intersafena (también conocida como vena Giacomini).

La mayoría de las venas tienen válvulas venosas para garantizar el flujo de sangre unidireccional. Por ejemplo, las venas superficiales, profundas y la mayoría de las perforantes en una extremidad inferior contienen válvulas bicúspides. En consecuencia, en determinadas realizaciones, el armazón tubular acelular comprende una estructura de válvula, y la estructura de válvula se reacondiciona/recelulariza para proporcionar una válvula venosa funcional en el vaso sanguíneo personalizado. La estructura de la válvula puede derivar de una válvula venosa nativa o de la síntesis y/o ensamblaje del armazón. Se conocen en la técnica métodos de evaluación de la función de una válvula venosa, incluyendo, pero sin limitación, un ensayo *in vitro* de competencia de las válvulas. En determinadas realizaciones, el método comprende además evaluar la función de la válvula venosa (por ejemplo, usando un ensayo de competencia de las válvulas *in vitro*) del armazón tubular acelular.

En determinadas realizaciones, la estructura de la válvula en el armazón tubular acelular se reacondiciona/recelulariza durante el reacondicionamiento/recelularización del resto de la superficie interna del armazón, es decir, no se toma ninguna etapa adicional para reacondicionar/recelularizar específicamente la estructura de la válvula. En determinadas realizaciones, las válvulas reacondicionadas/recelularizadas son positivas para CD31. Las válvulas reacondicionadas/recelularizadas también pueden ser positivas para actina de músculo liso, positivas para vWF y/o caracterizarse por la presencia de células de músculo liso fusiformes.

En determinadas realizaciones, el vaso sanguíneo personalizado tenía una o más características de un vaso sanguíneo nativo. En determinadas realizaciones, la vena personalizada preparada mediante un método desvelado en el presente documento comprende válvulas reacondicionadas/recelularizadas que tienen propiedades mecánicas de fuerza en el primer pico por encima de 0,8 N. En determinadas realizaciones, el vaso sanguíneo personalizado preparado mediante un método desvelado en el presente documento no demuestra fugas cuando se somete a ensayo.

Métodos de tratamiento o uso

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un vaso sanguíneo personalizado desvelado en el presente documento para uso en terapia. En determinadas realizaciones, la presente divulgación proporciona el vaso sanguíneo personalizado para su uso en el trasplante en un sujeto. En determinadas realizaciones, la presente divulgación proporciona el vaso sanguíneo personalizado para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno de un vaso sanguíneo de un sujeto que lo necesite.

Los términos "tratar", "tratado", o "tratamiento", y otros equivalentes gramaticales como se usan en la presente divulgación, incluyen aliviar, disminuir, mejorar o prevenir una enfermedad, afección o síntomas, prevenir síntomas adicionales, mejorar o prevenir las causas metabólicas subyacentes de los síntomas, inhibir la enfermedad o afección, por ejemplo, detener el desarrollo de la enfermedad o afección, aliviar la enfermedad o afección, provocar la regresión de la enfermedad o afección, aliviar una afección provocada por la enfermedad o afección, o detener los síntomas de la enfermedad o afección, y tienen por objeto incluir la profilaxis. Los términos incluyen además lograr un beneficio terapéutico y/o un beneficio profiláctico. Por beneficio terapéutico se entiende la erradicación o mejoría del trastorno subyacente que se está tratando. Además, se logra un beneficio terapéutico con la erradicación o mejoría de uno o más de los síntomas fisiológicos asociados al trastorno subyacente de manera que se observa una mejoría en el paciente, a pesar de que el paciente todavía puede estar afectado por el trastorno subyacente.

Los métodos desvelados en el presente documento son particularmente adecuados para generar vasos sanguíneos modificados por ingeniería de tipo autólogo. Tienen las ventajas de: (1) ser no inmunogénicos y, por lo tanto, tienen un riesgo mínimo de rechazo del injerto o respuesta inmunitaria adversa; (2) obviar la necesidad de inmunosupresión y, por lo tanto, menos riesgo para el paciente después de la cirugía y de por vida; (3) no tener restricción de longitud; (4) estar más fácilmente disponibles, en comparación con venas de donantes compatibles o venas autólogas; (5) estar compuestos por componentes naturales (es decir, MEC, células endoteliales y células de músculo liso) y, por lo tanto, tienen cualidades superiores a la mayoría de las venas sintéticas y artificiales, incluyendo la conservación de los factores de crecimiento angiogénicos residuales y la integridad biomecánica; (6) requerir la producción invasiva de vena en comparación con la recogida de vena autóloga para el trasplante; (7) permitir un procedimiento rápido y mínimamente invasivo para el sujeto mediante el uso de sangre entera; (8) celularizarse e integrarse biológicamente en el cuerpo del sujeto y sus funciones (reparación, crecimiento, inmunodefensa).

En consecuencia, en un aspecto, la presente divulgación proporciona un método de cirugía que comprende implantar el vaso sanguíneo personalizado desvelado en el presente documento en un sujeto (por ejemplo, humano) que lo necesite. En otro aspecto, la presente divulgación proporciona el vaso sanguíneo personalizado desvelado en el presente documento para su uso en la implantación en un sujeto (por ejemplo, humano) que lo necesite. En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un vaso sanguíneo personalizado preparado mediante cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento, en donde el vaso sanguíneo personalizado se ha implantado en un sujeto (por ejemplo, humano) mediante cirugía.

En determinadas realizaciones, el vaso sanguíneo personalizado es autólogo. Como se usa en el presente documento,

el término "autólogo" significa que la sangre utilizada en el método de preparación de un vaso sanguíneo personalizado procede del sujeto que recibe el implante o la cirugía. En determinadas realizaciones, en donde el vaso sanguíneo personalizado se produce mediante la descelularización de un vaso sanguíneo nativo, el donante del vaso sanguíneo nativo no es el mismo individuo que el receptor del vaso sanguíneo personalizado. En determinadas realizaciones, en donde el vaso sanguíneo personalizado se produce mediante la descelularización de un vaso sanguíneo nativo, el vaso sanguíneo nativo se obtiene de una especie animal adecuada (por ejemplo, cerdo, ovejas, vaca).

Los métodos de cirugía desvelados en el presente documento son útiles para tratar diversas enfermedades o trastornos vasculares. En consecuencia, en determinadas realizaciones, el sujeto tiene una enfermedad o trastorno vascular, por ejemplo, una enfermedad o trastorno venoso. En determinadas realizaciones, la enfermedad o trastorno venoso se selecciona del grupo que consiste en trombosis venosa profunda (TVP), insuficiencia venosa crónica (IVC) (también conocida como síndrome posflebítico), varices, ulceración venosa (por ejemplo, ulceración venosa de la pierna) y cáncer recurrente de la pierna (por ejemplo, provocado por reflujo venoso profundo y/o hipertensión venosa). En determinadas realizaciones, el vaso sanguíneo personalizado se implanta, se trasplanta o se injerta para reemplazar un segmento del vaso sanguíneo nativo afectado por una cualquiera de las enfermedades o trastornos vasculares. En determinadas realizaciones, el vaso sanguíneo personalizado es una vena y comprende al menos una válvula venosa.

En determinadas realizaciones, el método de cirugía trata, mejora y/o palia uno o más síntomas que incluyen dolor sordo, pesadez o calambres en las piernas, picor y hormigueo, dolor que empeora al estar de pie, dolor que mejora cuando se levantan las piernas, hinchazón de las piernas, enrojecimiento de las piernas y los tobillos, cambios en el color de la piel alrededor de los tobillos, venas varicosas en la superficie (superficiales), engrosamiento y endurecimiento de la piel de las piernas y los tobillos (lipodermatoesclerosis), úlceras en las piernas y los tobillos, y heridas que tardan en sanar en las piernas o los tobillos.

En determinadas realizaciones, el método de cirugía desvelado en el presente documento trata y/o mejora la IVC. IVC define aquellas manifestaciones de enfermedad venosa que son resultado de la hipertensión venosa ambulatoria, definida como la incapacidad para reducir la presión venosa con el ejercicio. En circunstancias normales, las válvulas venosas y las bombas musculares de las extremidades inferiores limitan la acumulación de sangre en las venas de las extremidades inferiores. El fracaso de las bombas musculares de las extremidades inferiores debido a la obstrucción del flujo de salida, la debilidad muscular-fascial, la pérdida de movimiento articular o la insuficiencia valvular se asocia a insuficiencia venosa periférica.

En determinadas realizaciones, el método de cirugía desvelado en el presente documento trata y/o mejora la ulceración venosa. Las ulceraciones venosas son heridas debidas al mal funcionamiento de las válvulas venosas, por lo general de las piernas (es decir, ulceración venosa de la pierna). Las úlceras venosas surgen cuando las válvulas tienen una función reducida y el reflujo de sangre provoca la acumulación de sangre en las venas y un aumento de la presión en las venas y los capilares. Esto conduce a otras complicaciones relacionadas, tales como edema, inflamación, endurecimiento del tejido, desnutrición de la piel y eccema venoso. Las úlceras venosas son grandes, poco profundas, decoloradas debido a la fuga de pigmento que contiene hierro en los glóbulos rojos hacia el tejido, y pueden tener secreción. Las úlceras se sitúan con mayor frecuencia alrededor del maléolo medial o posterior.

En determinadas realizaciones, el método de cirugía desvelado en el presente documento restablece la presión venosa normal de las extremidades inferiores. Por ejemplo, al caminar, la presión venosa de las extremidades inferiores se reduce de aproximadamente 100 mm de Hg (dependiendo de la altura) a una media de 18 mm de Hg a aproximadamente 25 mm de Hg en 7 a 12 pasos. Se observan cambios de presión similares con la flexión plantar del tobillo de pie o la elevación del talón, transfiriendo el peso al antepié (maniobra de puntillas). La presión venosa ambulatoria (PVA) puede determinarse usando una aguja de calibre 21 para medir la respuesta a 10 movimientos de puntillas, por lo general a una velocidad de 1 por segundo, en la vena dorsal del pie. Al reanudar una posición de pie declarada, la presión hidrostática se restablece después de una media de 31 segundos. La incidencia de ulceración tiene una relación lineal con los aumentos de PVA por encima de 30 mm de Hg. Un aumento de PVA también se asocia a un tiempo de llenado venoso al 90 % de menos de 20 segundos. A diferencia de la PVA, los cambios de volumen pueden medirse de forma no invasiva mediante pletismografía. El reflujo rápido (es decir, un llenado venoso de más de 7 ml/s) y la disfunción de la bomba de la pantorrilla se asocian a una alta incidencia de ulceración. Las válvulas reacondicionadas/recelularizadas en las venas, tras el injerto, restablecen la PVA normal, el reflujo rápido normal y/o la disfunción normal de la bomba de la pantorrilla. Preferentemente, una válvula venosa en el vaso sanguíneo personalizado, tras el injerto, restablece la tolerancia normal de la presión de reflujo de aproximadamente 100 mm de Hg, y se reduce a una media de aproximadamente 18 mm de Hg a aproximadamente 25 mm de Hg durante la caminata de 7 a 12 pasos.

En determinadas realizaciones, el método de cirugía desvelado en el presente documento trata y/o mejora los síntomas de válvulas incompetentes en el muslo. En determinadas realizaciones, el tratamiento y/o la mejoría de los síntomas se consigue restableciendo la relación de trabajo normal entre las bombas musculares y las válvulas venosas. Las bombas musculares del miembro inferior incluyen las del pie, la pantorrilla y el muslo. Entre estas, la bomba de la pantorrilla es la más importante ya que es la más eficiente, tiene la mayor capacitancia y genera las presiones más altas (200 mm de mercurio durante la contracción muscular). La extremidad normal tiene un volumen

de pantorrilla que varía de 1500 a 3000 cc, un volumen venoso de 100 a 150 cc, y expulsa más del 40 % al 60 % del volumen venoso con una sola contracción.

Durante la contracción, los músculos gastrocnemio y sóleo impulsan la sangre hacia las venas poplítea y femoral de gran capacidad. Las válvulas reacondicionadas/recelularizadas de la presente divulgación evitan el flujo retrógrado (reflujo) durante la relajación posterior, generando presión negativa y extrayendo sangre del sistema superficial al profundo a través de venas perforantes competentes. Las válvulas reacondicionadas/recelularizadas disminuyen progresivamente la presión venosa hasta que el flujo de entrada arterial es igual al flujo de salida venoso. La presente divulgación establece que cuando cesa el ejercicio en un sujeto, las venas con válvulas reacondicionadas/recelularizadas llenan lentamente el lecho capilar, provocando un retorno lento a la presión venosa de reposo.

Aunque el músculo rodea las venas del muslo, la contribución de la contracción del músculo del muslo al retorno venoso es mínima en comparación con la bomba del músculo de la pantorrilla. La acción de bombeo debida a la compresión del plexo venoso plantar durante la deambulación prepara la bomba de la pantorrilla. Diversas bombas de pierna trabajan junto con una función de válvula competente para devolver la sangre venosa desde la extremidad distal a la proximal. Los vasos sanguíneos personalizados de la presente divulgación son para su uso en el restablecimiento de bombas de pierna funcionales para devolver la sangre venosa desde la extremidad distal a la proximal.

Biorreactores

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un biorreactor para preparar un vaso sanguíneo personalizado, comprendiendo el biorreactor una bomba (por ejemplo, una bomba peristáltica, una bomba de gravedad, una bomba de émbolo u otra bomba adecuada), un recipiente, un primer conector y un segundo conector, en donde los conectores primero y segundo están conectados directa o indirectamente al recipiente, en donde cada conector está conectado a un extremo de un armazón tubular para preparar un vaso sanguíneo personalizado preparado mediante uno cualquiera de los métodos de preparación de un vaso sanguíneo personalizado desvelados en el presente documento, en donde cuando los conectores primero y segundo están conectados a los dos extremos de un armazón tubular, la bomba media la circulación de una suspensión, sangre entera o solución en un circuito cerrado. En muchas realizaciones, es ventajoso que una bomba (por ejemplo, una bomba peristáltica, una bomba de gravedad, una bomba de émbolo u otra bomba adecuada) utilizada en el presente documento sea lo suficientemente suave como para minimizar el daño a las células sanguíneas.

En determinadas realizaciones, el biorreactor comprende además un armazón tubular (por ejemplo, un armazón tubular acelular (por ejemplo, un vaso sanguíneo descelularizado o un armazón tubular bioimpreso)). En determinadas realizaciones, el biorreactor comprende además una suspensión o sangre entera como se desvela en el presente documento para preparar un vaso sanguíneo personalizado.

En determinadas realizaciones, al menos dos partes del biorreactor se proporcionan por separado, con una instrucción para conectarlos en el orden prescrito. En consecuencia, en un aspecto, la presente divulgación proporciona un kit para ensamblar un biorreactor para preparar un vaso sanguíneo personalizado, comprendiendo el biorreactor una bomba peristáltica, un recipiente, un primer conector y un segundo conector, en donde los conectores primero y segundo pueden estar conectados directa o indirectamente al recipiente, en donde cada conector puede estar conectado a un extremo de un armazón tubular para preparar un vaso sanguíneo personalizado preparado mediante uno cualquiera de los métodos de preparación de un vaso sanguíneo personalizado desvelados en el presente documento, en donde cuando los conectores primero y segundo están conectados a los dos extremos de un armazón tubular, la bomba peristáltica media la circulación de una suspensión, sangre entera o solución en un circuito cerrado. En determinadas realizaciones, el kit comprende además un armazón tubular (por ejemplo, un armazón tubular acelular (por ejemplo, un vaso sanguíneo descelularizado o un armazón tubular bioimpreso)).

En determinadas realizaciones, los conectores primero y segundo son conectores Luer. En determinadas realizaciones, el primer recipiente está conectado directamente al recipiente por un tubo, y/o el segundo recipiente está conectado directamente al recipiente por un tubo.

En determinadas realizaciones, el biorreactor comprende un puerto de muestreo. En determinadas realizaciones, el puerto de muestreo es una parte del recipiente. En determinadas realizaciones, el puerto de muestreo permite la extracción de una muestra de la suspensión, sangre entera o solución del circuito cerrado. En determinadas realizaciones, el puerto de muestreo comprende un sensor para medir la temperatura, el pH y/o la concentración de oxígeno, CO₂ o nutriente (por ejemplo, D-glucosa) en la suspensión, sangre entera o solución.

En determinadas realizaciones, el puerto de muestreo también es útil como puerto de inyección. En determinadas realizaciones, el biorreactor comprende además un puerto de inyección. En determinadas realizaciones, el puerto de inyección está o puede estar conectado a un depósito de oxígeno, CO₂ o nutriente (por ejemplo, D-glucosa).

En determinadas realizaciones, la superficie externa del armazón tubular se pone en contacto con la suspensión, sangre entera o solución en el recipiente. Este biorreactor permite el reacondicionamiento/recelularización de la

superficie interna y la superficie externa del almacén tubular al mismo tiempo.

En determinadas realizaciones, el biorreactor comprende además una cámara que encierra el almacén tubular, permitiendo de este modo el contacto de la superficie externa del almacén tubular con un líquido en la cámara. La cámara también se puede esterilizar, manteniendo el almacén tubular en condiciones asépticas.

El experto en la materia entenderá que el mismo biorreactor podría usarse para descelularizar un vaso sanguíneo nativo o para acondicionar un almacén tubular. El experto en la materia puede seleccionar la suspensión, la sangre entera o la solución adecuadas con relación al uso.

Pueden usarse diversas bombas, que no rompen los componentes celulares y acelulares en la solución de sangre incluso durante períodos de perfusión prolongados. Estas pueden ser bombas peristálticas, bombas de gravedad, bombas de pistón o similares. La inclusión de puertos de muestra en la configuración del biorreactor permite el muestreo estéril del medio de perfusión, así como la inyección estéril de componentes adicionales sin abrir el circuito cerrado y, en algunos casos, sin siquiera detener la perfusión. En una versión mejorada de la configuración del biorreactor, pueden acoplarse en línea en el tubo de perfusión sensores una diversidad de parámetros pertinentes tales como la glucosa, el pH, el contenido de oxígeno, el contenido de CO₂, los metabolitos, etc. Esto permite un seguimiento continuo del proceso de personalización durante RC o durante DC, y controlar el progreso y el éxito de la ruptura y retirada de células y ADN.

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a un biorreactor para preparar un vaso sanguíneo personalizado, comprendiendo el biorreactor una bomba peristáltica, un recipiente que comprende un puerto de muestreo, un primer conector y un segundo conector, en donde los conectores primero y segundo están conectados directa o indirectamente al recipiente, en donde cada conector está conectado a un extremo de un almacén tubular para preparar un vaso sanguíneo personalizado preparado mediante los métodos desvelados en el presente documento, en donde cuando los conectores primero y segundo están conectados a los dos extremos de un almacén tubular, la bomba peristáltica media la circulación de una suspensión o solución en un circuito cerrado.

En algunas realizaciones, los conectores primero y segundo son conectores Luer. En algunas realizaciones, el puerto de muestreo es un puerto de inyección. En algunas realizaciones, el biorreactor comprende además un puerto de inyección. En algunas realizaciones, el puerto de inyección está conectado a un depósito de D-glucosa. En algunas realizaciones, el primer recipiente está conectado directamente al recipiente por un tubo, y/o el segundo recipiente está conectado directamente al recipiente por un tubo. En algunas realizaciones, el biorreactor comprende uno o más puertos de muestra. En algunas realizaciones, el biorreactor comprende además uno o más sensores para medir el nivel de glucosa. En algunas realizaciones, el biorreactor comprende además un módulo de ajuste de pH. En algunas realizaciones, el biorreactor comprende además un módulo de ajuste de CO₂.

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a un método de preparación de un vaso sanguíneo personalizado, comprendiendo el método poner en contacto una superficie de un almacén tubular acelular con un componente contenido en la sangre entera, que se enriquece o selecciona antes de su uso en contacto con la superficie.

En algunas realizaciones, el componente se selecciona de trombocitos, células nucleadas, proteínas, factores de crecimiento, factores de señalización, inmunoglobulinas y cualesquier combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, el componente se enriquece mediante centrifugación, centrifugación en gradiente, separación mediante adhesión selectiva, filtración o clasificación. Se conocen bien en la técnica muchos métodos para enriquecer o clasificar componentes. Algún ejemplo de métodos para la clasificación incluye la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) y la clasificación de células activadas magnéticamente (MACS).

Definiciones

Ha de entenderse que los métodos no se limitan a las realizaciones particulares descritas y, como tales, pueden variar. También ha de entenderse que la terminología utilizada en el presente documento sólo tiene el fin de describir realizaciones particulares y no tiene por objeto ser limitante. El alcance de la presente tecnología estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

Como se usan en el presente documento, determinados términos pueden tener los siguientes significados definidos. Según se usan en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la expresión "una célula" incluye una única célula así como una pluralidad de células, incluyendo mezclas de las mismas.

Como se usa en el presente documento, la expresión "que comprende" pretende significar que las composiciones y los métodos incluyen los elementos citados, pero sin excluir otros. "Que consiste esencialmente en", cuando se usa para definir composiciones y métodos, significará la exclusión de otros elementos de importancia esencial para la composición o el método. "Que consiste en" significará la exclusión de más de oligoelementos de otros ingredientes para las composiciones reivindicadas y las etapas sustanciales del método. Las realizaciones definidas por cada uno

de estas expresiones de transición están dentro del alcance de la presente divulgación. En consecuencia, se pretende que los métodos y composiciones puedan incluir etapas y componentes adicionales (que comprenden) o que incluyan como alternativa etapas y composiciones sin importancia (que consisten esencialmente en) o como alternativa, con la intención únicamente de las etapas o composiciones del método indicadas (que consisten en).

El término "aproximadamente" se refiere a cualquier alteración mínima en un valor absoluto establecido (por ejemplo, la concentración o cantidad de un agente) que no cambia la eficacia, actividad, acción, resultados, etc., indicados. En las realizaciones, el término "aproximadamente" puede incluir $\pm 10\%$ de un valor numérico o punto de dato especificado. El término "aproximadamente" incluye el valor indicado (por ejemplo, "aproximadamente el 1 %" incluye el 1 % así como alteraciones mínimas del mismo).

Los intervalos pueden expresarse en la presente divulgación como desde "aproximadamente" un primer valor particular, y/o hasta "aproximadamente" un segundo valor particular. Cuando se expresa un intervalo de este tipo, también se contempla otro aspecto que comprende desde el primer valor particular y/o hasta el segundo valor particular. De forma similar, cuando los valores se expresan como aproximaciones, mediante el uso de "aproximadamente", se entiende que el valor particular forma otro aspecto. Se entiende además que los puntos finales de cada uno de los intervalos son significativos tanto con respecto al otro punto final como independientemente del otro punto final. También se entiende que hay una serie de valores divulgados en la presente divulgación, y que cada valor también se desvela como "aproximadamente" ese valor particular además del propio valor. También se entiende que, a lo largo de la solicitud, los datos se proporcionan en varios formatos distintos, y que estos datos representan puntos finales y puntos de inicio e intervalos para cualquier combinación de puntos de datos. Por ejemplo, si se desvelan un punto de dato específico "10" y un punto de dato específico "15", se entiende que mayor que, mayor que o igual que, menos que, menos o igual que, e igual que 10 y 15 se consideran desvelados, así como entre 10 y 15. También se entiende que se desvela cada unidad entre dos unidades específicas. Por ejemplo, si se desvelan 10 y 15, entonces también se desvelan 11, 12, 13 y 14.

Como se usa en el presente documento, la expresión "que comprende" pretende significar que las composiciones y los métodos incluyen los elementos citados, pero sin excluir otros. "Que consiste esencialmente en", cuando se usa para definir composiciones y métodos, significará la exclusión de otros elementos de importancia esencial para la composición o el método. "Que consiste en" significará la exclusión de más de oligoelementos de otros ingredientes para las composiciones reivindicadas y las etapas sustanciales del método. Las realizaciones definidas por cada uno de estas expresiones de transición están dentro del alcance de la presente divulgación. En consecuencia, se pretende que los métodos y composiciones puedan incluir etapas y componentes adicionales (que comprenden) o que incluyan como alternativa etapas y composiciones sin importancia (que consisten esencialmente en) o como alternativa, con la intención únicamente de las etapas o composiciones del método indicadas (que consisten en).

Ejemplos

Ejemplo 1: Vena personalizada modificada por ingeniería tisular (P-TEV)

Se prepararon y sometieron a ensayo injertos porcinos de P-TEV *in vivo* para demostrar su seguridad y viabilidad. Específicamente, se eligió *vena cava* de cerdo como un sistema modelo sustituto para imitar el tamaño y el grosor de la pared del vaso de una vena femoral humana.

Preparación de P-TEV

Se recuperó *vena cava* de cadáveres de cerdos y se descelularizó para retirar las células y el ADN del donante. Brevemente, los segmentos de vena se perfundieron secuencialmente con Solución de DC 1, Solución de DC 2 y Solución de DC 3, con una etapa de lavado con agua estéril entre diferentes Soluciones de DC. En este ejemplo, se usaron 24 horas de Tritón X, 8 h de TNBP y 16 h de ADNasa. Después, los segmentos de vena se lavaron minuciosamente con Solución base de DC y PBS durante 1 hora y un lavado final de 48 horas. A continuación, los segmentos de vena se esterilizaron en Solución de esterilización y se lavaron minuciosamente en PBS (lavados de esterilización de 1 hora y lavado final de 48 horas). Después, cada segmento de vena DC estéril se transfirió a un recipiente con una etiqueta adherida permanentemente y se congeló a -80°C en PBS. Las composiciones de las soluciones utilizadas en la descelularización y esterilización se proporcionaron en la Tabla 1.

Tabla 1: Soluciones para la descelularización y la esterilización

Solución	Composición
Solución base de DC	Agua estéril, EDTA 5 mM
Solución de DC 1	Triton X-100 al 1 % en Solución base de DC
Solución de DC 2	Fosfato de tri-n-butilo (TNBP) al 1 % en Solución base de DC
Solución de DC 3	40 U/ml de ADNasa I en PBS con CaCl_2 y MgCl_2
Solución de esterilización	Solución de ácido peracético al 0,1 % en PBS

La acellularidad de los armazones de venas descelularizados se verificó mediante histología con tinción con hematoxilina y eosina (H y E) y tinción con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Específicamente, los puntos azules en la tinción con H y E, que representan núcleos, se observaron en las venas no procesadas pero no en las muestras descelularizadas. De forma similar, la fluorescencia de DAPI, que indica ADN, fue detectable en las venas no procesadas pero no en las muestras descelularizadas. El contenido de ADN de los segmentos de vena descelularizados también se evaluó usando un fluorómetro Qubit™. El contenido promedio de ADN bicatenario (ADNbc) de las muestras antes de la descelularización fue de 152 ng por mg de tejido, con un error típico de la media (ETM) de 32 ng/mg. Después de la descelularización, las muestras contenían 0,5 ng de ADNbc por mg de tejido, con un ETM de 0,04 ng/mg, que era aproximadamente $0,3 \pm 0,03$ % del material sin procesar. Por lo tanto, la descelularización hizo que los armazones de venas estuvieran sustancialmente exentos de ADN.

Para reacondicionar/recelularizar los armazones de venas, se tomaron muestras de sangre entera periférica (SEP) de cerdos receptores mediante venopunción de rutina en tubos de vidrio vacutainer BD estériles de 10 ml que contenían 17 UI/ml de heparina de sodio. La SEP se mezcló con una solución de perfusión de órganos *ex-vivo* (solución STEEN™) en una relación 1:1, y se complementó con 10 ng/ml de FGF-2 humano recombinante (rhFGF-2), 80 ng/ml de VEGF humano recombinante (rhVEGF) y 5 µg/ml de ácido acetilsalicílico, generando de este modo una suspensión de sangre autóloga. El reacondicionamiento/recelularización se realizó en un biorreactor cerrado. Después del prelavado con PBS y el pretratamiento con heparina, los armazones de venas se perfundieron de forma continua con la suspensión de sangre en recirculación cerrada durante 7 días. Durante la perfusión, el nivel de glucosa en la suspensión de sangre se mantuvo entre 3-11 mmol/l. En estas condiciones, los componentes celulares y otros de la suspensión de sangre autóloga repoblaron los armazones de venas.

Cirugía

Los P-TEV reacondicionados/recelularizados se implantaron en los cerdos receptores mediante cirugía. Específicamente, se hizo una incisión a través de la *línea alba*. Se usó una técnica convencional para localizar la *vena cava* para los dos primeros cerdos: los intestinos se mantuvieron aparte con gasas humedecidas en solución salina y ganchos quirúrgicos, y la parte de *vena cava* entre la *vena renal* y la bifurcación a la *vena femoral* se disecó exenta del tejido circundante. Debido a la formación de adherencias intestinales en uno de estos dos animales, se usó una técnica retroperitoneal mejorada para localizar la *vena cava* en los otros seis cerdos (cuatro implantados con P-TEV, dos sometidos a cirugía simulada): el peritoneo y la pared abdominal se separaron hasta la *vena cava* en el lado derecho, dejando de este lado los intestinos intactos. Para los cerdos trasplantados con P-TEV, la *vena cava* se cortó y se adjuntó una P-TEV de aproximadamente 4 cm con anastomosis de extremo a extremo. En los cerdos operados de forma simulada, la tensión de la vena no permitió cortar y suturar en dos lugares como en los trasplantes de P-TEV. En cambio, se cortó la vena cava y se suturó con una anastomosis.

Durante la cirugía, los cerdos se sedaron con tiletamina, zolazepam y medetomidina, y después se intubaron para la anestesia con isoflurano. Se administró buprenorfina durante la cirugía para aliviar el dolor posoperatorio. Para prevenir la coagulación y la trombosis, se trató a todos los cerdos por vía peroral con 160 mg de ácido acetilsalicílico una vez al día durante una semana antes de la cirugía, y con 2 mg/kg de rivaroxabán dos veces al día desde un día antes de la cirugía hasta la eutanasia. Adicionalmente, se administraron 10.000 UI de heparina por vía intravenosa durante la cirugía.

Condiciones de los cerdos después de la cirugía

Dos cerdos desarrollaron adherencia intestinal después de la cirugía y tuvieron que ser sacrificados antes del punto final planificado debido a los síntomas del íleo. Uno era un cerdo con P-TEV en el que la *vena cava* se localizó con la técnica convencional. Tuvo que ser sacrificado 16 días después de la cirugía, y los intestinos mostraron adherencias masivas en la disección. El otro era un cerdo simulado sacrificado 7 días después de la cirugía. El peritoneo de este cerdo se rompió durante la cirugía y hubo que manipular los intestinos con gasas humedecidas y ganchos como con la técnica convencional.

No se observó adherencia intestinal durante las disecciones de los otros seis cerdos. Entre estos seis animales, se sacrificó un cerdo simulado y tres cerdos con P-TEV en el punto final planificado de 4-5 semanas después de la cirugía. Hubo que sacrificar antes dos cerdos con P-TEV debido a complicaciones no relacionadas con el trasplante de *vena cava*. Uno se sacrificó 3 días después de la cirugía, porque se rompieron las suturas de la pared abdominal. El otro se sacrificó 17 días después de la cirugía debido a una fractura de rodilla en la pata delantera izquierda.

Caracterización de las P-TEV trasplantadas

Se realizó una angiografía con anestesia antes de la eutanasia de un cerdo simulado y tres cerdos con P-TEV que estaban vivos 4-5 semanas después de la cirugía. Se inyectó líquido de contraste en una vena femoral y la *vena cava* se controló *in vivo* usando un rayo X C-bow. Como se muestra en las FIG. 1A-1B, la vena operada con P-TEV (FIG. 1B) y la simulada (FIG. 1A) estaban ambas abiertas con flujo sanguíneo libre.

Después de la eutanasia de cada cerdo, se examinó la *vena cava*. Las dos venas operadas de forma simulada y las seis P-TEV estaban todas abiertas con flujo sanguíneo libre sin signos de coagulación o trombosis. No se observó coágulo de sangre ni trombosis en el examen macroscópico.

- 5 Después se seccionaron las venas y se prepararon para la tinción con H y E y la tinción con DAPI. Como se muestra en las FIG. 2A-2B, en el cerdo con P-TEV (FIG. 2B) sacrificado 3 días después de la cirugía, se observaron células en el injerto de P-TEV mediante tinción con H y E y DAPI. La muestra de 3 días se analizó como se describe. Las muestras después de RC también se analizaron de forma rutinaria (estas representaban la última fase de las muestras de P-TEV no implantadas). El injerto de P-TEV estaba bien celularizado en el cerdo sacrificado 17 días después de la
- 10 cirugía. De cuatro a cinco semanas después de la cirugía, el número de células en la P-TEV (FIG. 2B) parecía ser igual al del tejido nativo (FIG. 2A). Es importante destacar que, no se observó hiperplasia de la íntima, una complicación potencial importante en este estudio, en la P-TEV implantada.

- 15 Las muestras de venas también se caracterizaron mediante inmunohistoquímica. En el cerdo sacrificado dos semanas después de la cirugía, las partes proximal, central y distal de la P-TEV tenían un número sustancial de células, y pudieron identificarse células positivas para CD31 (FIG. 3A-3D). La FIG. 3A muestra *vena cava* nativa próxima a las anastomosis. Las FIG. 3B-3D muestran las partes proximal (FIG. 3B), central (FIG. 3C) y distal (FIG. 3D) de la P-TEV. Las puntas de flecha indican células positivas para CD31.

- 20 En un cerdo sacrificado 4-5 semanas después de la cirugía, las partes proximal, central y distal de la P-TEV tenían una densidad celular similar a la de la *vena cava* nativa y el lumen de la P-TEV se cubrió con una capa de endotelio positivo para CD31 (FIG. 4A-4D). Las FIG. 4A-4D son una serie de inmunohistogramas que muestran la tinción con DAPI y la inmunotinción con CD31 de *vena cava* cuatro semanas después de la cirugía. La FIG. 4A muestra *vena cava* nativa próxima a las anastomosis. Las FIG. 4B-4D muestran las partes proximal (FIG. 4B), central (FIG. 4C) y
- 25 distal (FIG. 4D) de la P-TEV. Las puntas de flecha indican células positivas para CD31.

- La morfología de las células de tipo endotelial que recubrían la superficie luminal era prácticamente indistinguible de la de la *vena cava* nativa (FIG. 5A-5B). Las FIG. 5A-5B es una serie de imágenes con un aumento de 40x que muestra la tinción con H y E de *vena cava* nativa (FIG. 5A) y trasplante de P-TEV (FIG. 5B) cuatro semanas después de la
- 30 cirugía. Las flechas indican células endoteliales en el tejido nativo y células con morfología similar a células endoteliales en placa en el trasplante de P-TEV.

En resumen, este estudio *in vivo* sugirió que las P-TEV eran seguras y factibles para el trasplante de venas.

35 **Ejemplo 2: Preparación de la solución de perfusión fisiológica:**

- Se agitaron de forma continua 900 ml de solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) con calcio y magnesio a 60 rpm a temperatura ambiente. Se añadieron lentamente 74 g de albúmina sérica humana depositando en capas el polvo sobre la superficie del líquido (para evitar la formación de grumos) y la mezcla se agitó hasta que
- 40 se disolvió totalmente. Se evitó la formación de espuma reduciendo temporalmente las rpm. Posteriormente se añadieron a la solución 6,7 g de Dextrano-40 y la mezcla se agitó hasta que se disolvió totalmente. El pH se tituló a 7,4 usando NaOH y el volumen final se ajustó a 1000 ml usando DPBS con calcio y magnesio. Después, la solución de perfusión fisiológica se esterilizó por filtración usando un filtro estéril de baja unión a proteínas, en alícuotas de 25 ml en tubos estériles de 50 ml y almacenados a 2-8 °C durante hasta 12 meses.

45 **Ejemplo 3: Preparación de una solución de perfusión fisiológica alternativa (que no requiere HSA cara):**

- Se colocaron 25 ml de plasma sanguíneo estéril del paciente en un tubo estéril de 50 ml. Después, al plasma se le añadieron 1,5 ml de una solución madre de Dextrano-40 filtrada en condiciones estériles de 100 g/l y la solución se
- 50 agitó cuidadosamente hasta que se mezcló totalmente. La solución de perfusión fisiológica estéril se almacenó a 2-8 °C durante hasta 7 días.

Ejemplo 4: Variaciones adicionales de la solución de perfusión fisiológica preparada:

- 55 DPBS con calcio y magnesio que contenía HSA 70 g/l, Dextrano-40 5 g/l y Glucosa 11 mmol/l
- DPBS con calcio y magnesio que contenía HSA 40 g/l y Dextran-40 10 g/l
- Plasma sanguíneo humano que contenía HSA 30 g/l y Dextrano-40 5 g/l adicionales
- 60 Plasma sanguíneo humano que contenía Dextrano-40 5 g/l adicional y un total de Glucosa 11 mmol/l
- DPBS con calcio y magnesio que contenía HSA 70 g/l, Dextrano-60 5 g/l y Glucosa 11 mmol/l

65 **Ejemplo 5: Composiciones de soluciones de perfusión fisiológicas disponibles en el mercado:**

Solución	Euro collins	Universidad de Wisconsin	Celsior	Perfadex
Componente coloidal	Glucosa	Lactobionato, Rafinosa, Hidroxietil almidón	Lactobionato, Manitol	Dextrano
Tampón	Fosfatos, Bicarbonatos	Fosfatos	Histidina	Fosfatos
Antioxidante		Alopurinol, Glutación	Glutación, Manitol	
Osmolaridad (mOsm/l)	375	330	320	292
Glucosa (mmol/l)	180			5
Na ⁺ (mmol/l)	10	25	100	138
K ⁺ (mmol/l)	115	120	15	6
Ca ²⁺ (mmol/l)			0,25	
Mg ²⁺ (mmol/l)		5	13	0,8
Cl ⁻ (mmol/l)	15	20		142

Ejemplo 6: Preparación de un vaso sanguíneo personalizado a partir de un armazón tubular acelular preparado mediante bioimpresión

- 5 El Ejemplo 1 describe un método de preparación de un vaso sanguíneo personalizado usando un armazón tubular descelularizado. Como alternativa, se prepara un vaso sanguíneo personalizado a partir de un armazón acelular tubular bioimpreso. Brevemente, el armazón de vaso sanguíneo bioimpreso se prepara en un polímero (natural o sintético), que tiene una forma de gel, forma de esponja, forma de espuma, forma de parche o forma semilíquida/fluida. En este método, un armazón de polímero se perfunde con sangre entera o sangre entera diluida en una solución, por ejemplo, una suspensión, que incluye sangre entera, para la preparación de un vaso sanguíneo personalizado.

Ejemplo 7: Implantación de un vaso sanguíneo personalizado

- 15 Se selecciona un sujeto que necesita un vaso sanguíneo trasplantado, y se implanta/trasplanta en el sujeto un vaso sanguíneo personalizado preparado mediante el método proporcionado en el Ejemplo 1 o 2 de la presente divulgación. Se controla el pronóstico del sujeto y la recuperación postrasplante.

- 20 Un vaso sanguíneo personalizado desvelado en el presente documento se utiliza para el tratamiento de diversas enfermedades y trastornos de los vasos sanguíneos, tales como trombosis venosa profunda (TVP), insuficiencia venosa crónica (IVC), varices, ulceración venosa (por ejemplo, ulceración venosa de la pierna) y cáncer recurrente de la pierna (por ejemplo, provocado por reflujo venoso profundo y/o hipertensión venosa).

- 25 Específicamente, se selecciona un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno de los vasos sanguíneos. El vaso sanguíneo personalizado se introduce en el sujeto mediante cirugía: se retira un segmento del vaso sanguíneo nativo afectado por la enfermedad o trastorno; el vaso sanguíneo personalizado o un segmento funcional del mismo se anastomosa al vaso sanguíneo nativo, reemplazando el segmento del vaso sanguíneo nativo que se retira. El vaso sanguíneo híbrido generado a partir de la cirugía es funcionalmente similar o equivalente a un vaso sanguíneo nativo y mejora los síntomas, incluyendo el dolor sordo, pesadez o calambres en las piernas, picor y hormigueo, dolor que empeora al estar de pie, dolor que mejora cuando se levantan las piernas, hinchazón de las piernas, enrojecimiento de las piernas y los tobillos, cambios en el color de la piel alrededor de los tobillos, venas varicosas en la superficie (superficiales), engrosamiento y endurecimiento de la piel de las piernas y los tobillos (lipodermatoesclerosis), úlceras en las piernas y los tobillos, y heridas que tardan en sanar en las piernas o los tobillos.

Ejemplo 8

- 35 El proceso de recelularización/reacondicionamiento de un armazón tubular acelular para preparar un vaso sanguíneo personalizado implicó una pequeña muestra de sangre entera del paciente. En este ejemplo, el proceso de recelularización/reacondicionamiento que implica tanto componentes celulares como no celulares (por ejemplo, trombocitos, células nucleadas, proteínas, factores de crecimiento, factores de señalización, inmunoglobulinas) de la sangre entera se seleccionan o enriquecen para su uso en el proceso. En un ejemplo, se combinan con sangre entera componentes celulares y no celulares de la sangre entera. Como alternativa, los componentes celulares y no celulares de la sangre entera se usan en lugar de la sangre entera en el proceso de recelularización/reacondicionamiento. Este último proceso se realiza por razones relacionadas con el proceso y/o para optimizar la personalización de un vaso sanguíneo. El enriquecimiento o la selección se realiza usando, por ejemplo, centrifugación, centrifugación en gradiente, adhesión selectiva, cromatografía, filtración o clasificación (FACS, MACS).

REIVINDICACIONES

1. Un método de preparación de un vaso sanguíneo personalizado, que comprende poner en contacto una superficie de un armazón tubular acelular con una muestra de sangre entera sin diluir de un sujeto que necesita el vaso sanguíneo personalizado, en donde el contacto se realiza durante 3 días a 14 días.
2. El método de la reivindicación 1, en donde una población de células en la muestra de sangre entera puebla el armazón tubular acelular.
3. El método de la reivindicación 1, en donde la muestra de sangre entera comprende uno o más factores no celulares, en donde uno o más factores no celulares de la sangre entera pueblan el armazón, y en donde los factores no celulares promueven la celularización del armazón tubular acelular y la compatibilidad del hospedador con el vaso tras el injerto.
4. El método de la reivindicación 1, en donde la muestra de sangre entera sin diluir comprende además un factor antitrombótico.
5. El método de la reivindicación 4, en donde el factor antitrombótico comprende un agente anticoagulante.
6. El método de la reivindicación 5, en donde el agente anticoagulante comprende heparina o un dextrano.
7. El método de la reivindicación 6, en donde:
 - (i) la heparina está presente en la muestra de sangre entera sin diluir a una concentración de 0,5 UI/ml +/- 10 % a 150 UI/ml +/- 10 % al comienzo del contacto con la superficie del armazón tubular acelular, opcionalmente en donde la heparina está presente en la muestra de sangre entera sin diluir a una concentración de 6,7 UI/ml +/- 10 % al comienzo del contacto con la superficie del armazón tubular acelular;
 - (ii) el dextrano es dextrano-40; o
 - (iii) el dextrano está presente en la muestra de sangre entera sin diluir o la suspensión que comprende la muestra de sangre entera a una concentración de 1 g/l +/- 10 % a 55 g/l +/- 10 % al comienzo del contacto con la superficie del armazón tubular acelular.
8. El método de la reivindicación 4, en donde el agente antitrombótico comprende ácido ascórbico.
9. El método de la reivindicación 8, en donde:
 - (i) el ácido ascórbico está presente en la muestra de sangre entera sin diluir a una concentración de 0,2 µg/ml +/- 10 % a 200 µg/ml +/- 10 % al comienzo del contacto con la superficie del armazón tubular acelular; o
 - (ii) la concentración de ácido ascórbico está presente en la muestra de sangre entera sin diluir o la suspensión que comprende la muestra de sangre entera a una concentración de 5 µg/ml +/- 10 % al comienzo del contacto con la superficie del armazón tubular acelular.
10. El método de la reivindicación 4, en donde el factor antitrombótico comprende ácido acetilsalicílico.
11. El método de la reivindicación 10, en donde el ácido acetilsalicílico está presente en la muestra de sangre entera sin diluir a una concentración de 0,2 µg/ml +/- 10 % a 200 µg/ml +/- 10 % al comienzo del contacto con la superficie del armazón tubular acelular.
12. El método de la reivindicación 10, en donde el ácido salicílico está presente en la muestra de sangre entera sin diluir a una concentración de 5 µg/ml +/- 10 % al comienzo del contacto con la superficie del armazón tubular acelular.
13. El método de la reivindicación 1, en donde la muestra de sangre entera comprende además un nivel fisiológico igual o superior al promedio de la población de un factor de crecimiento seleccionado del grupo que consiste en: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), interleucina (IL)-3, IL-4, neutrofina (NT)-6, pleiotrofina (HB-GAM), midcina (MK), proteína-10 inducible por interferón (IP-10), factor plaquetario (FP)-4, proteína-1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1), RANTES (CCL-5, ligando 5 de quimiocina (motivo C-C), IL-8, IGF, factor de crecimiento fibroblástico (FGF)-1, FGF-2, FGF-3, FGF-4, FGF-5, FGF-6, FGF-7, FGF-8, FGF-9, factor de crecimiento transformante (TGF)-β, VEGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)-A, PDGF-B, HB-EGF, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de necrosis tumoral (TNF)-α, factor de crecimiento (IGF)-1 similar a la insulina y cualquier combinación o combinaciones de los mismos.
14. El método de la reivindicación 13, en donde el factor de crecimiento es un factor de crecimiento fibroblástico (FGF)-2.
15. El método de la reivindicación 1, en donde el contacto se realiza durante:
 - (i) de 5 días a 7 días;

- (ii) de 7 días a 9 días; o
- (iii) 7 días.

FIG. 1A

Simulado

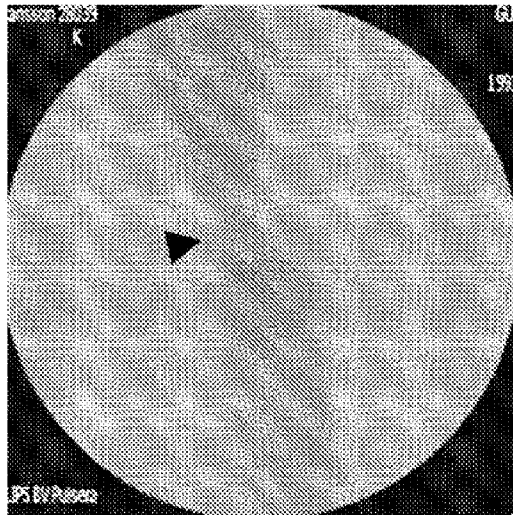


FIG. 1B

P-TEV

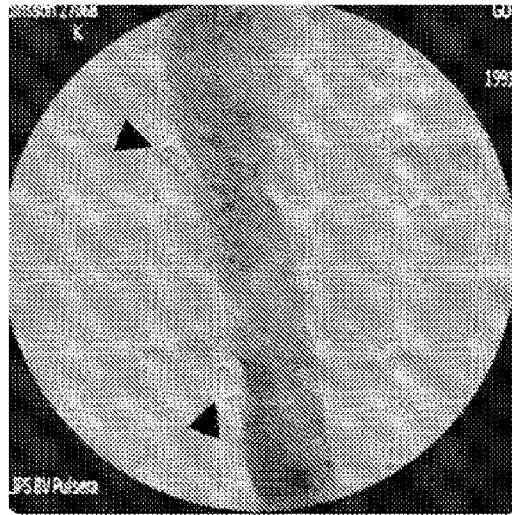


FIG. 2A

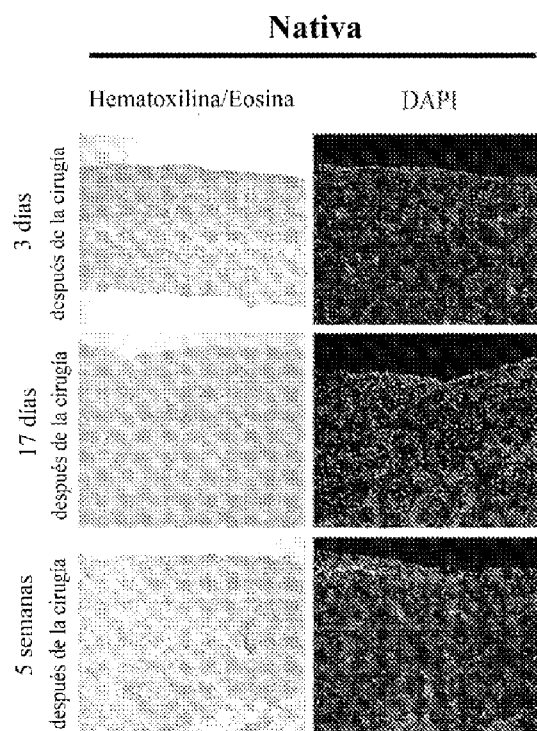
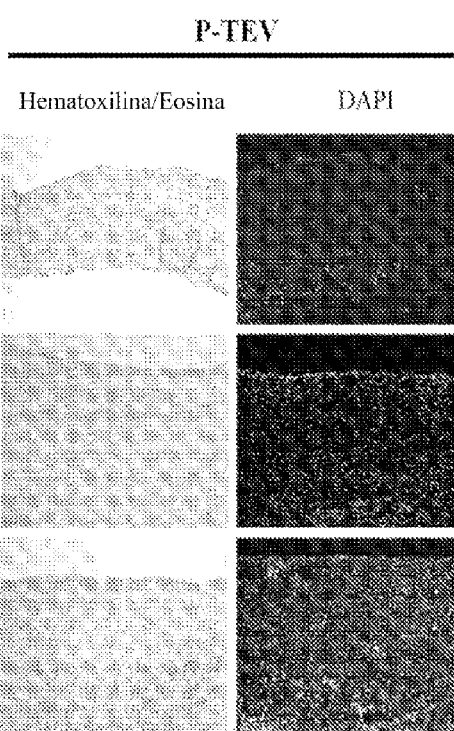
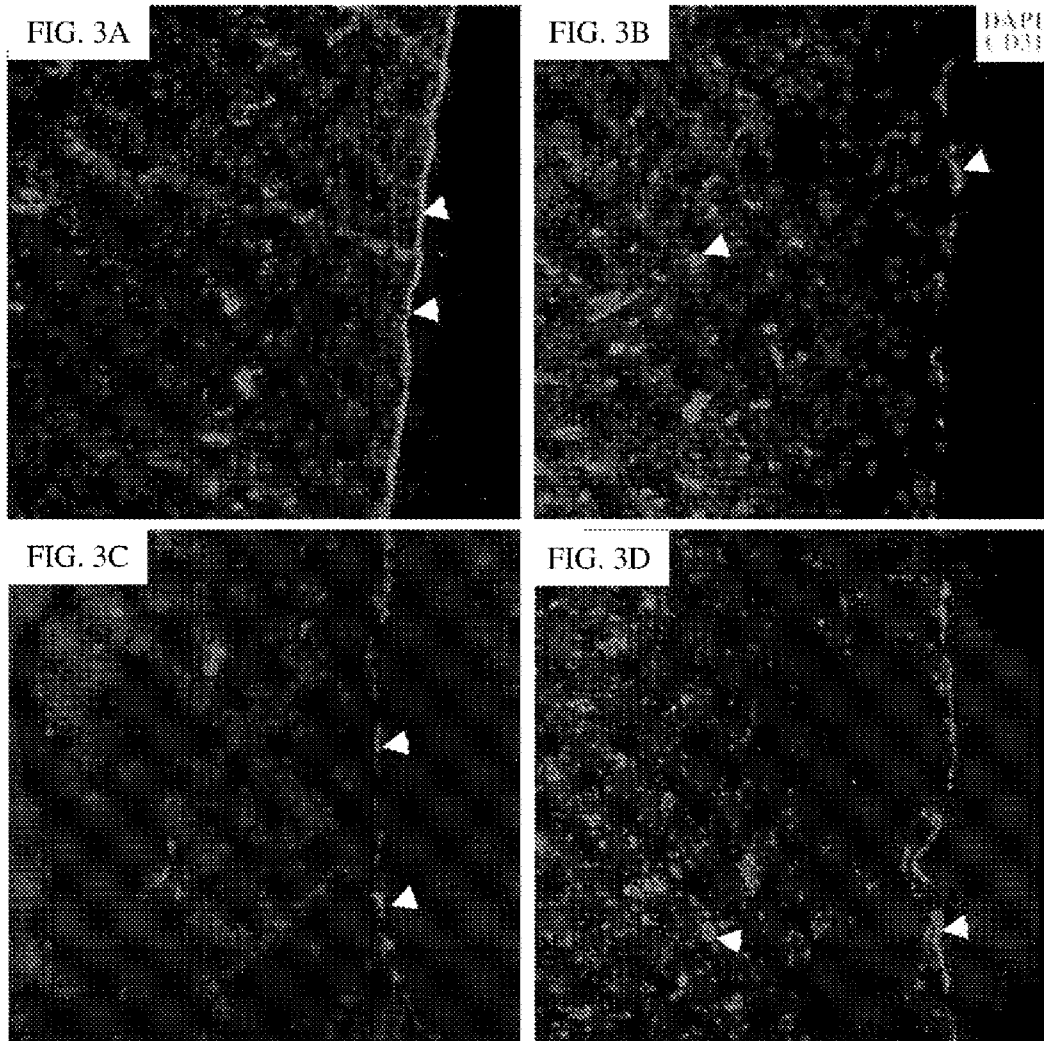


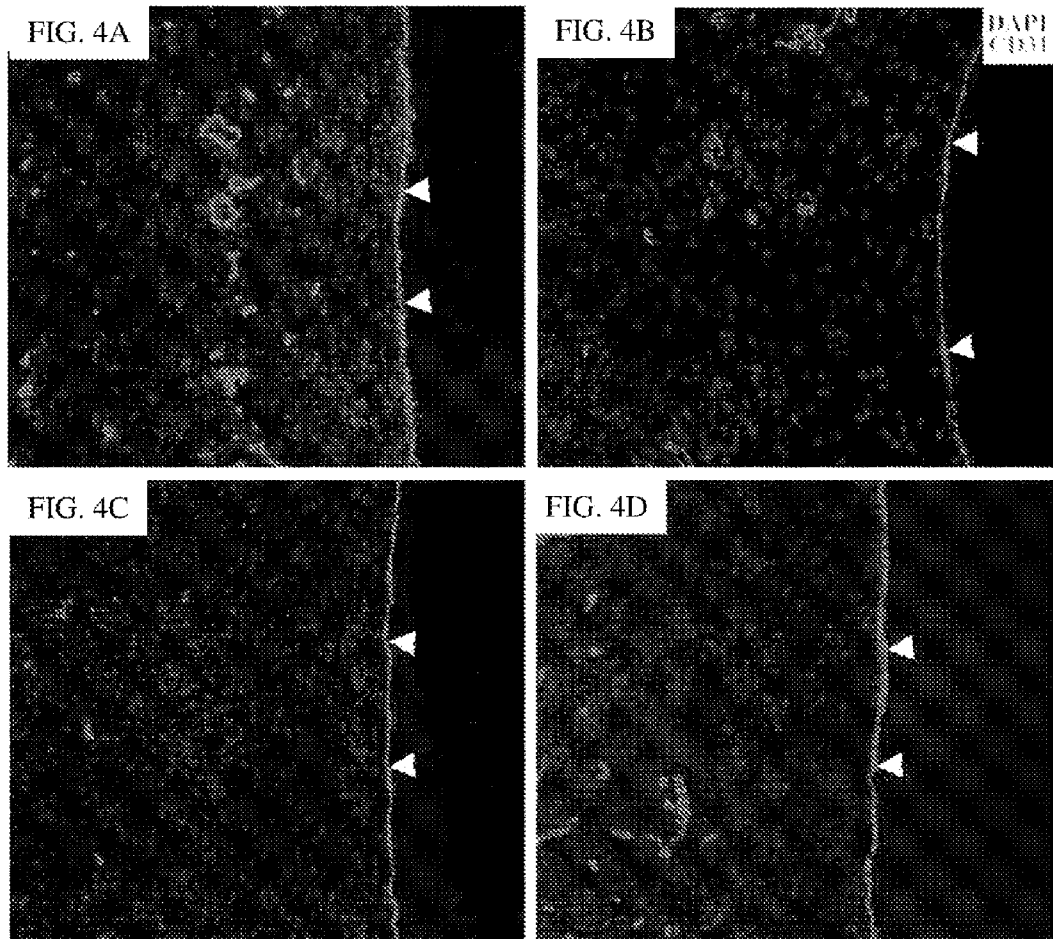
FIG. 2B



Celularización de la *vena cava* dos semanas después de la cirugía



Celularización de la *vena cava* cuatro semanas después de la cirugía



Morfología de células lumbinales cuatro semanas después de la cirugía

