

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 719 128**

51 Int. Cl.:

A61L 27/48 (2006.01)

A61L 27/36 (2006.01)

A61L 27/38 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.10.2012 PCT/US2012/059955**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.04.2013 WO13056049**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.10.2012 E 12784129 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2019 EP 2766061**

54 Título: **Prótesis tubulares**

30 Prioridad:

14.10.2011 US 201161547350 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.07.2019

73 Titular/es:

**HUMACYTE, INC. (50.0%)
2525 E NC Highway 54
Durham, NC 27713, US y
YALE UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**NIKLASON, LAURA;
HUANG, ANGELA;
DAHL, SHANNON y
ZHAO, LIPING**

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

ES 2 719 128 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

Prótesis tubulares

5 SECTOR TÉCNICO DE LA INVENCION

La presente invención está relacionada con el área de los reemplazos artificiales para conductos urinarios enfermos o dañados.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 Actualmente en los EE. UU., hay 2.000 pacientes al año, aproximadamente, que necesitan reemplazo de tejido traqueal. Entre las causas de esto se incluyen el cáncer de tráquea, infecciones invasivas de la tráquea o los bronquios y los traumatismos. No existen reemplazos disponibles actualmente para la tráquea en humanos. En el mejor de los casos, cuando se extirpa un segmento de tráquea, la única opción quirúrgica es "juntar" los dos extremos de la tráquea y coserlos juntos, esperando que la anastomosis no se "separe" posteriormente.

20 Actualmente en los EE. UU., 4.000 pacientes al año, aproximadamente necesitan un reemplazo esofágico. Esto es debido principalmente al cáncer de esófago, aunque el traumatismo y la infección son causas de un pequeño número de casos de reemplazo esofágico. Actualmente, no existe un reemplazo disponible para el tejido esofágico. Lo que se hace actualmente para reemplazar el esófago es uno de estos dos procedimientos. Bien un segmento del estómago se separa de sus conexiones en el abdomen y lleva al pecho, para anastomosar al esófago remanente; o bien un segmento de intestino grueso (es decir, colon) se extirpa del paciente y se cose para reemplazar el tejido esofágico extirpado. Ambos procedimientos tienen muchas complicaciones y, sin duda, un reemplazo esofágico viable es médicamente necesario.

30 Cada año en los EE. UU., 10.000 pacientes, aproximadamente, se someten a una cistectomía y necesitan un conducto urinario para drenar la orina fuera del cuerpo [Healthcare Cost and Utilization Project, NIS, 2007.]. En casi todos los casos, se cultiva el intestino del paciente para formar una desviación urinaria no continua o una derivación urinaria continente que está cateterizada de forma intermitente para drenar la orina a través de un estoma continente [Konety, B. R, Joyce, G. F, Wise, M., Bladder and upper tract urothelial cancer. Journal of Urology, 2007. 177: págs.1636-1645.]. Debido a la simplicidad quirúrgica y menores tasas de complicaciones, la creación de un conducto urinario no continuo es el procedimiento más común para drenar la orina después de la cistectomía. De la manera más general, se extrae una longitud de 15-25 cm del íleon del paciente para utilizarlo como conducto urinario y el intestino restante se anastomosa de nuevo [Gudjonsson, S., Davidsson, T., Mansson, W., Incontinent urinary diversion. BJU International, 2008. 102: págs. 1320-1325.]. Un extremo del segmento ileal cultivado se anastomosa a los uréteres del paciente y el otro extremo posteriormente se lleva a la piel para formar un estoma a través del cual la orina puede drenar.

40 Aunque se utilizan ampliamente, los conductos ileales plantean muchos problemas que pueden llevar a complicaciones a corto y largo plazo. [Konety, B. R, Allareddy, V., Influence of post-cystectomy complications on cost and subsequent outcome. Journal of Urology, 2007. 177: 280-287.]. A corto plazo, los pacientes pueden sufrir complicaciones en el sitio de la recolección intestinal, entre las que se incluyen fugas anastomóticas y peritonitis. Además, los conductos urinarios ileales pueden sufrir de isquemia y necrosis, lo que puede conducir a la perforación, a la descomposición anastomótica y al escape de orina del conducto. A largo plazo, muchos de los pacientes sufren de acidosis metabólica hiperclorémica crónica, debido a la reabsorción de electrolitos en la orina a través de la pared del conducto. Dado que los conductos íleos albergan bacterias, los pacientes también suelen sufrir infecciones urinarias recurrentes y pielonefritis, ya que las bacterias del conducto infectan el sistema urinario más proximal. Por lo tanto, hay una significativa necesidad médica de un procedimiento mejorado para la desviación urinaria, que evite muchas de las complicaciones asociadas con la utilización de conductos ileales [Dahl, D. M, McDougan, W. S, Campbell-Walsh, Urology, 9ª edición: Use of intestinal segments and urinary diversion, ed. A. J Wein, Kavoussi, L. R, Novick, AC 2009]. El documento US2002/0115208 A1 da a conocer constructos de tejido de ingeniería descélularizado, tales como constructos de orina, que se producen al sembrar células que se sabe que secretan moléculas de la matriz extracelular, tales como colágeno y elastina.

55 Existe una necesidad continua en la técnica de reemplazos para estos conductos importantes, así como para otros tejidos tubulares en el cuerpo, tales como uréteres, uretras, intestino, etc.

60 CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

La presente invención se define por las reivindicaciones adjuntas. Sólo los conductos anatómicos, según las reivindicaciones son parte de la presente invención. Los conductos anatómicos que no se incluyen en las reivindicaciones solo están presentes con fines ilustrativos.

65 La presente invención es un conducto urinario artificial para su implantación en un paciente que necesita desviación urinaria y drenaje. El conducto comprende una matriz extracelular tubular, sustancialmente acelular, formada como

un tubo, así como un estent tubular. La matriz extracelular está producida y secretada por células musculares lisas no autólogas. El conducto urinario artificial tiene una resistencia a la rotura superior a 0,13 MPa (1.000 mm de Hg).

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

5 Figura 1: esquema de colocación del estent con la estructura de PGA circundante dentro del biorreactor, en preparación para el cultivo.

10 Figura 2: siembra de células musculares lisas (CML) sobre la malla PGA que reviste el estent metálico en el biorreactor.

15 Figuras 3A-3B: fotos generales de la tráquea de ingeniería. Células de músculo liso cultivadas sobre la malla PGA que rodea un estent metálico. Después de 8 semanas de cultivo, las células se eliminan por descelularización, dejando la matriz extracelular de ingeniería que reviste el estent metálico. Esta tráquea de ingeniería tiene 1,6 cm de diámetro y aproximadamente 8 cm de longitud. Figura 3A: fotografía del exterior de la tráquea de ingeniería, que muestra un tejido liso que cubre toda la superficie externa. Figura. 3B: fotografía del interior de la tráquea de ingeniería, que muestra un tejido liso que cubre toda la superficie interna.

20 Figura 4: foto general de la tráquea de ingeniería, que muestra un tejido impermeable. La tráquea de ingeniería tiene un diámetro de 1,6 cm y 8 cm de longitud. La tráquea de ingeniería, que comprende tejido descelularizado que reviste un estent metálico, se rellena con líquido coloreado y se mantiene en alto. El tejido acelular, que envuelve las paredes y el extremo del estent, es suficientemente robusto para contener líquidos, tal como lo demuestra el nivel visible de líquido rojo dentro de la tráquea (flecha).

25 Figura 5: contenido de colágeno de los tejidos de la tráquea de ingeniería: un ensayo bioquímico de hidroxiprolina muestra el contenido de colágeno como fracción del peso del tejido seco, antes y después de la descelularización. El aumento del colágeno como fracción del peso seco después de la descelularización indica que se elimina el material celular, mientras que la matriz extracelular de colágeno permanece.

30 Figura 6: esquema del cultivo del esófago de ingeniería en el biorreactor.

Figura 7: esófago acelular de ingeniería mantenido con pinzas. El segmento de esófago de ingeniería es de 1,5 cm de diámetro por 5 cm de largo. Es lo suficientemente fuerte como para sostener la retracción con dos juegos de pinzas, tal como se muestra. El esófago se muestra por flechas a cada lado

35 Figuras 8A-8C: histologías de esófago de ingeniería. Figura 8A: la tinción H&E del esófago de ingeniería muestra núcleos celulares (púrpura) y matriz extracelular (rosa). La barra de escala es de 50 micras. Figura 8B: la tinción tricrómica de Masson muestra colágeno azul en el esófago de ingeniería, los núcleos de las células aparecen de color rojo. La barra de escala es de 50 micras. Figura 8C: la tinción tricrómica de Masson del esófago de ingeniería descelularizado y los núcleos rojos están ausentes, lo que indica la pérdida de células. Barra de escala = 50 micras.

40 Figura 9: resistencia de retención de la sutura del esófago de ingeniería. La retención de la sutura en gramos se muestra antes de la descelularización, y después de los regímenes de descelularización que duran entre 45 y 80 minutos. Después de 45 minutos de descelularización, la resistencia de retención de la sutura es superior a 100 gramos. Esto es indicativo de un tejido de ingeniería implantable (Dahl, y otros, Science Translational Medicine 3: 68pc2, 2011).

45 Figura 10: contenido de colágeno del esófago de ingeniería. Contenido de hidroxiprolina del esófago de ingeniería antes de la descelularización, y después de 45 y 80 minutos de descelularización. La descelularización progresiva elimina más material celular, lo que aumenta el porcentaje de colágeno que queda en el tejido como una fracción del peso seco.

50 Figura 11: anatomía de la implantación del conducto ileal. Los uréteres se cosen a un segmento del íleon, que se lleva a la piel como un estoma.

55 Figuras 12A-12C: conductos de ingeniería acelulares. La figura 12A muestra una fotografía general de un conducto de 6 mm después del cultivo del biorreactor y la descelularización. La figura 12B muestra una imagen de microscopía electrónica de barrido de un conducto acelular, que muestra una superficie luminal lisa y poros dentro de la pared. La figura 12C muestra el conducto presurizado a 0,01 MPa (100 mm de Hg), que no muestra fugas de líquido y un excelente radio de torsión, no mayor de 1,5 cm.

60 Figuras 13A-13C: figura 13A: fotografía general de un injerto aorto-caval en un babuino; figura 13B: la inmunotinción para actina alfa, un marcador de músculo liso, muestra células de músculo liso infiltradas en el injerto (g); figura 13C: la proliferación de células T en respuesta al injerto del conducto es menor que en el control de teflón.

65 Figuras 14A-14G: dibujos esquemáticos que muestran el crecimiento y desarrollo de las células y la matriz sobre un

estent. La figura 14A muestra una cubierta de malla bioabsorbible que rodea un estent en su superficie externa. La figura 14B muestra una cubierta de malla bioabsorbible en la superficie interior de un estent. La figura 14C muestra una cubierta de malla bioabsorbible colocada en las superficies interior y exterior del estent. La figura 14D muestra las dos capas descritas en la figura 14C que han sido cosidas entre sí para unificar las dos capas. La figura 14E muestra células (blancas) que se han sembrado sobre la malla. La figura 14F muestra una matriz (gris) que ha sido sintetizada y secretada por las células sembradas. La figura 14G muestra una matriz acelular que envuelve el estent después de que las células se hayan eliminado mediante un proceso de descelularización.

Figura 15: cuello de rata abierto, con corte de tráquea nativa y dos anillos cartilagosos retirados. La tráquea de ingeniería se anastomosa al tejido traqueal proximal, con el extremo distal de la tráquea de ingeniería extendiéndose hacia arriba.

Figura 16: tráquea humana de ingeniería descelularizada implantada en un receptor de rata. Los tejidos traqueales nativo y de ingeniería están indicados en la figura.

Figura 17: tinción de H&E de tejido que ha crecido desde la vía aérea del huésped dentro de la tráquea de ingeniería después de 2 semanas de implantación. Las puntas de flecha blancas señalan los glóbulos rojos en los capilares en el crecimiento del tejido, lo que indica una extensa microvascularización del tejido interno. La barra de escala es de 50 micras.

Figura 18: inmunotinción del crecimiento de tejido hacia el interior de la luz de la tráquea de ingeniería después de 2 semanas de implantación. El azul es tinción nuclear DAPI, mientras que el rojo es inmunotinción para la citoqueratina-14, un marcador del epitelio traqueal. Esta imagen muestra que muchas de las células en el lumen de la tráquea de ingeniería fueron crecimiento de epitelio interno desde el receptor. Barra de escala = 50 micras.

Figura 19: imagen H&E de baja potencia de una tráquea descelularizada humana de ingeniería que se implantó en una rata desnuda durante 6 semanas y posteriormente se extirpó. Se indica el tejido fibroso nativo circundante. Las ubicaciones de los sostenes estructurales de estent de nitinol, visibles como agujeros cuadrados en el tejido, se indican con asteriscos (*). La matriz de ingeniería implantada tiene alguna evidencia de la infiltración celular después de 6 semanas de implantación (núcleos visibles entre sostenes estructurales y cerca de la parte inferior de la imagen). El crecimiento de tejido nuevo en el lumen de la tráquea de ingeniería es visible. Barra de escala = 200 micras.

Las figuras 20A-20B: se cosió un injerto en el esófago de un cerdo para reemplazar un segmento extirpado del esófago (figuras 20A-20B). Esto muestra el potencial para la sustitución de la circunferencia completa del esófago.

Figura 21: tinción de H&E de la tráquea de ingeniería que se implantó y posteriormente se extirpó después de 6 semanas. Los agujeros en la sección de tejido que contenía los sostenes estructurales del estent se indican mediante flechas negras. Claramente, los sostenes estructurales del estent están densamente integrados en el tejido de la matriz extracelular (rosa y naranja en la imagen). Una capa interna de tejido de epitelio (núcleos púrpuras) también se ha formado en la tráquea de ingeniería. Barra de escala = 1 mm.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los presentes inventores han desarrollado nuevas herramientas quirúrgicas para reparar conductos anatómicos dañados, entre los que se incluyen conductos urinarios. Debido a que los conductos se forman sembrando células en un sustrato tubular, en lugar de láminas que se enrollan posteriormente, para formar un tubo o tubos en capas, no están sujetos a los riesgos de deslizamiento o fuga que pueden surgir con un enfoque en capas. Además, no se producen deslizamientos ni fugas entre el tejido y el sustrato tubular (por ejemplo, el estent) dado que el sustrato tubular o estent está integrado dentro del tejido no en capas. Además, no hay riesgo de desenrollar las capas de tejido. Los conductos forman un tejido artificial compuesto en el cual, un estent está totalmente envuelto y revestido dentro de la matriz extracelular que ha sido cultivada y secretada *in situ*. La matriz extracelular es una matriz presente de forma natural que se produce por células. La matriz es una matriz extracelular presente de forma natural que se produce por células vivas. Debido a su modo de fabricación, no existen huecos ni se forman durante la implantación y después de la misma. Los conductos son, efectivamente, tejidos de material compuesto. Los tejidos pueden ser un material compuesto de células y matriz (descelularizada), fragmentos de polímeros, y un material de estent. La matriz extracelular puede, por ejemplo, unir los sostenes estructurales del estent e incorporar completamente el material de estent.

Los tejidos formados de este modo tienen una matriz (ECM) que se ajusta "firmemente" alrededor de los sostenes estructurales del estent. Los tejidos están adyacentes al estent, están conectados con el mismo, están en contacto con el mismo, están al lado del mismo, tienen un límite común con el mismo, tocan al mismo, están contiguos al mismo, comparten un borde común con el mismo. Forman un tejido compuesto unitario que no está sujeto a separación ni deconvolución en partes constituyentes.

Las células utilizadas en los conductos pueden ser alogénicas, autólogas, singénicas o xenogénicas. Normalmente,

las células utilizadas en la producción de los conductos se matan y/o eliminan antes de su utilización. La muerte y/o eliminación de células disminuye el potencial de reacciones inmunitarias adversas. La muerte y/o eliminación de células deja menos del 50%, menos del 75%, menos del 80%, menos del 85%, menos del 90% o menos del 95% de las células viables, según se ha evaluado mediante tinción con azul de tripano, incorporación de nucleótidos, o síntesis de proteínas. La matriz extracelular restante está altamente conservada entre los individuos y entre especies, lo que hace que sea menos probable que provoque una reacción inmunitaria adversa que las células vivas. Las células del músculo liso vascular son un tipo de célula que se puede utilizar para producir la matriz extracelular. Estas se pueden aislar a partir de cualquier vasculatura de un ser humano u otro mamífero, incluso de la aorta. Gran parte de la matriz extracelular secretada comprende colágeno. El colágeno puede comprender, como mínimo, el 5%, como mínimo, el 10%, como mínimo, el 15%, como mínimo, el 20%, como mínimo, el 25%, como mínimo, el 30% de la matriz extracelular. Normalmente, la matriz extracelular crece hasta que alcanza un espesor de, como mínimo, 50 micras, como mínimo, 100 micras, como mínimo, 150 micras, como mínimo, 200 micras, como mínimo, 250 micras, como mínimo, 300 micras, como mínimo, 400 micras o, como mínimo, 500 micras. El diámetro de los conductos puede controlarse durante la fabricación. Normalmente estos pueden tener un diámetro interno de, como mínimo, 10, como mínimo, 15, como mínimo, 20, como mínimo, 25, como mínimo, 30, como mínimo, 35, 40, como mínimo, 45, como mínimo, 50 mm.

En algunas circunstancias, puede ser deseable tener células vivas en el conducto o dentro del mismo. Estas células se pueden sembrar en el conducto y bien cultivarse en cultivo o bien cultivarse *in situ*. Las células también pueden sembrarse *in situ*, mediante células endógenas del receptor que migran y se establecen sobre la prótesis artificial. Las células pueden derivarse del paciente o de otra fuente. Las células pueden ser útiles para imitar y recrear condiciones naturales en el huésped. Alternativamente, las células se pueden utilizar como fábricas *in situ* para producir un producto que es deseable, tal como una hormona del crecimiento, una quimioquina, un factor sanguíneo y similares. Entre las células adecuadas para sembrar en un conducto de vía aérea se incluyen, sin que constituyan limitación, células traqueales, tales como las células epiteliales, las células del cartílago, las células endoteliales, las células del músculo liso y los fibroblastos.

Un estent puede estar fabricado de metal, un polímero u otra sustancia biocompatible natural o artificial. El estent puede ser no degradable, o puede ser degradable. Estos estents tienen normalmente una estructura perforada, lo que permite la unión de capas internas y externas de sustrato, por ejemplo, malla o tejido. En algunas realizaciones, el estent está provisto de malla solo en la superficie externa del estent, lo que permite que las células hagan crecer una matriz extracelular en el exterior y que posteriormente envuelve completamente los sostenes estructurales del estent. En otras realizaciones, la malla se aplica solo a la superficie interna del estent, que después de la siembra de células permite también que las células envuelvan tanto la malla como los sostenes estructurales del estent con células y con matriz extracelular. Una malla adecuada que puede utilizarse como sustrato para el crecimiento celular está fabricada de ácido poliglicólico. Normalmente, durante el cultivo la malla de ácido poliglicólico se degrada espontáneamente, y los fragmentos de ella se lavan en el medio de cultivo o se fagocitan por las células cultivadas y se degradan. Algunos fragmentos pueden permanecer. Se pueden utilizar otros materiales biodegradables en sustratos no degradables, tal como se conoce en la técnica, tales como ácido poliláctico, policaprolactona, polianhidridos, polietilenglicol, así como otras sustancias poliméricas biocompatibles. Otros sustratos biocompatibles incluyen colágeno, gelatina, elastina, celulosa, alginato y otras sustancias que soportan el crecimiento de células en cultivo. Los sustratos pueden estar en un formato de malla, o pueden tomar la forma de un gel o una esponja.

Si bien los conductos se describen como tubulares, también pueden contener una o más ramificaciones, de modo que el conducto tiene la forma de, por ejemplo, una Y, X, T o F. Los conductos con dichas ramificaciones también se consideran tubulares. Los conductos descritos pueden implantarse para reemplazar, alinear, reforzar o desviar un conducto fisiológico existente o implantado.

Los conductos que se producen al crecer las células en un estent tubular pueden tener una ventaja adicional sobre los conductos formados utilizando láminas enrolladas dentro y fuera de un estent. Los conductos fabricados por células en crecimiento tienen la matriz extracelular fijada de forma rotacional con respecto al estent. Las superficies internas y externas de la matriz extracelular están fijadas de manera rotacional una respecto a la otra. Al estar fijadas de este modo, se minimiza el deslizamiento y las fugas. Las dos superficies pueden estar fijas de este modo, por ejemplo, entrelazando los sustratos sobre los que crecen las células que secretan la matriz extracelular. Las celdas y la matriz extracelular envuelven o unen los sostenes estructurales del estent e incorporan completamente el material del estent.

Los conductos que crecen mediante cultivo de células sobre un sustrato que cubre un estent tubular, ya sea en el interior o en el exterior o en ambos lados, tienen la ventaja de estar compuestos por un solo tejido que envuelve y reviste el material del estent. El material resultante es un verdadero material compuesto de tejido de estent. Esta configuración tiene muchas ventajas funcionales sobre los sistemas anteriores que implican envolver una lámina de tejido alrededor del interior o el exterior de un estent. Por ejemplo, en situaciones en las que el tejido se envuelve alrededor del estent, puede ocurrir que las láminas de tejido no se fusionen entre sí, o no se fusionen con el material del estent. Esta falta de fusión de las láminas de tejido da como resultado una construcción en la que las piezas de tejido y el material del estent pueden deslizarse entre sí, lo que da como resultado un conducto que es estructuralmente inestable. En contraste, cuando se cultivan células sobre una malla que cubre completamente el

material del estent, el conducto resultante se compone de una sola pieza de material compuesto de tejido-estent, y no contiene láminas de tejido que puedan moverse o deslizarse una respecto a otra. Dichos conductos son entonces más adecuados para diversas aplicaciones en las que el conducto debe ser hermético a líquidos o aire. Además, dichos conductos son más adecuados para servir como sustitutos de los tejidos tubulares nativos, tales como la tráquea, los bronquios, el intestino, el esófago, el uréter, el conducto urinario u otros tejidos tubulares que deben funcionar para contener líquidos o aire, o ambos. En contraste, los estents que están envueltos con láminas de tejido exógeno pueden no ser adecuados para estas aplicaciones, ya que el deslizamiento de los tejidos y el material del estent pueden causar fugas de aire o de líquido. Además, un material compuesto de un solo tejido-estent muestra propiedades de manipulación superiores para la implantación quirúrgica, en contraste con las láminas de tejido envueltas que pueden deslizarse y desprenderse del material del estent. Además, un material compuesto único de tejido-estent soportará los esfuerzos fisiológicos posteriores a la implantación, tales como la presurización, las fuerzas de cizalla, el flujo de fluido y similares, mientras que un estent encerrado en láminas de tejido puede deslaminarse y perder integridad estructural cuando se expone a fuerzas fisiológicas en el cuerpo.

La descelularización del conducto puede implicar la muerte y/o eliminación de células de una estructura o sustrato. Se puede utilizar cualquier medio conocido en la técnica, entre los que se incluyen, sin que constituyan limitación, la utilización de agitación y la utilización de detergentes. El proceso de descelularización debe equilibrarse entre los límites de ser lo suficientemente severo para matar o desalojar las células y lo suficientemente suave para mantener intacta la estructura de la matriz extracelular. La matriz extracelular substancialmente acelular permanece después del proceso de descelularización. La prótesis contiene menos del 50%, menos del 75%, menos del 80%, menos del 85%, menos del 90% o menos del 95% de las células viables, según se ha evaluado mediante tinción con azul de tripano, incorporación de nucleótidos BrdU, tinción TUNEL, o síntesis de proteínas.

Las prótesis o conductos pueden almacenarse antes de la implantación en un mamífero receptor. El almacenamiento puede tener lugar antes o después de que haya ocurrido la descelularización. El almacenamiento puede ser a varias temperaturas, pero generalmente será de 4°C o menos, 0°C, -20°C, -40°C o -60°C. El almacenamiento puede ser de, como mínimo, horas, como mínimo, días, como mínimo, semanas, como mínimo, meses o como mínimo, años. Además, los conductos pueden almacenarse a temperatura ambiente, a 20°C o menos, 25°C, 30°C, 35°C o 40°C. En general, no es deseable almacenar los conductos a temperaturas superiores a 40°C.

Los conductos urinarios pueden trasplantarse a un receptor, tal como un paciente humano, conectar a uno o ambos uréteres del paciente y drenar a través de un estoma en la piel, o reemplazar un segmento de uréter o uretra. Un conducto urinario tendrá típicamente una retención de sutura de más de 150 gramos, más de 175 gramos, más de 200 gramos o más de 225 gramos. Su resistencia a la ruptura es mayor que 0,13 MPa (1.000 mm de Hg), mayor que 0,17 MPa (1.250 mm de Hg), mayor que 0,20 MPa (1.500 mm de Hg) o mayor que 0,27 MPa (2.000 mm de Hg). Después de la implantación, un conducto urinario se puede poblar con células endógenas, tales como células epiteliales urinarias, células endoteliales, células de músculo liso, miofibroblastos, telocitos o células epiteliales dérmicas (por ejemplo, células epiteliales escamosas) o queratinocitos y fibroblastos. Si se desea, las células pueden sembrarse antes de la implantación. Un conducto urinario contiene un estent. Los conductos urinarios tienen normalmente entre 6 y 25 mm, a menudo más de 10 mm de diámetro.

El conducto urinario de ingeniería se puede producir cultivando células humanas sobre un sustrato, que también está revistiendo un estent. En estos casos, el conducto final contiene matriz extracelular humana. Sin embargo, los conductos urinarios de ingeniería pueden fabricarse utilizando cualquier célula muscular lisa vascular de mamíferos o primates, entre las que se incluyen las células musculares lisas vasculares humanas. Entre dichos primates o mamíferos se incluyen, sin que constituyan limitación, cerdo, caballo, burro, gato, ratón, rata, vaca, oveja, babuino, gibón y cabra. Además, los receptores de las prótesis pueden ser, sin que constituyan limitación, mamíferos, tales como seres humanos, perros, cerdos, caballos, burros, gatos, ratones, ratas, vacas, ovejas, babuinos, gibones y cabras.

EJEMPLO DE REFERENCIA 1

Preparación de la estructura de PGA traqueal

Una lámina de ácido poli(glicólico) (PGA) se corta en piezas de 5,4 cm x 8,5 cm y piezas de 5,2 cm x 8,5 cm. La malla de 5,2 cm x 8,5 cm de PGA se enrolla en un tubo y se inserta dentro de un estent de metal desnudo (1,7 x 8,5 cm). Posteriormente, se cose la malla de 5,4 cm x 8,5 cm de PGA alrededor del estent de metal desnudo utilizando la sutura de PGA absorbible, intercalando el estent entre las dos capas de malla de PGA. Se aplica cuidadosamente una aguja de ganchillo a lo largo de la construcción de PGA/estent para entrelazar las dos capas de PGA. Se cose una sutura no absorbible a través de ambos extremos de la construcción de PGA/estent para suspender la construcción dentro de un biorreactor especialmente diseñado para la reconstrucción de la tráquea. A continuación, la construcción se sumerge en solución de NaOH 1 M durante 2 minutos para tratar la superficie de la malla de PGA y, después, se enjuaga tres veces con agua destilada. La construcción de PGA/estent se ensambla a continuación en el biorreactor, tal como se muestra en la figura 1.

EJEMPLO DE REFERENCIA 2

Siembra de células musculares lisas (CML) y mantenimiento de cultivos traqueales

5 Las CML primarias se aislaron de aortas de perro y se expandieron en T-75 en medio de Eagle modificado por Dulbecco con bajo contenido de glucosa con el 20% de suero de bovino fetal (FBS). 120 millones de CML de P2 y P3 se resuspendieron en 7 ml de medio y se sembraron sobre la construcción PGA/estent dentro del biorreactor, tal como se muestra en la figura 2. La construcción se cultivó dentro del biorreactor de forma estática durante 12 semanas en 1,3 l de medio de Eagle modificado de Dulbecco con bajo contenido de glucosa con el 20% de FBS, factor de crecimiento de fibroblastos básico (10 ng/ml), factor de crecimiento derivado de plaquetas (10 ng/ml), ácido L-ascórbico, sulfato de cobre, HEPES, L-prolina, L-alanina, L-glicina y penicilina G (figura 2). El medio se cambió 1,5 veces por semana y el ácido ascórbico se complementó tres veces por semana.

EJEMPLO DE REFERENCIA 3

15 **Descelularización de la tráquea de ingeniería**

En primer lugar, la tráquea de ingeniería (6 cm de longitud) se incubó en 250 ml de tampón CHAPS (CHAPS 8 mM, NaCl 1 M y EDTA 25 mM en PBS) durante 45 minutos a 37°C con agitación a alta velocidad, seguido de un enjuague minucioso con PBS estéril. La tráquea de ingeniería se trató adicionalmente con 250 ml de tampón de dodecilsulfato de sodio (SDS) (SDS 1,8 mM, NaCl 1 M y EDTA 25 mM en PBS) durante 45 minutos a 37°C con agitación a alta velocidad. La tráquea de ingeniería se sometió a continuación a 2 días de lavado en PBS para eliminar completamente el detergente residual. Todas las etapas de descelularización se realizaron en condiciones estériles. La tráquea de ingeniería descelularizada se almacenó en PBS estéril que contenía 100 U/l de penicilina y 100 mg/ml de estreptomina a 4°C.

EJEMPLO DE REFERENCIA 4

30 **Preparación de la estructura de PGA de esófago**

La lámina de PGA de 6,5 cm x 10 cm se cose en una construcción cilíndrica con sutura de PGA absorbible alrededor de un tubo de silicona compatible (diámetro interior = 2 cm) con una línea de sutura que está alineada axialmente con la estructura cilíndrica de PGA. A continuación se cosen manguitos de Dacron en los extremos de la construcción tubular PGA, uno en cada extremo. La construcción se sumerge en solución 1 M de NaOH durante 2 minutos para tratar la superficie de la malla de PGA, seguido de tres lavados posteriores en agua destilada. La estructura de PGA y el tubo de silicona se ensamblan dentro de un biorreactor tal como se muestra en la figura 6.

EJEMPLO DE REFERENCIA 5

40 **Siembra de células musculares lisas (CML) y sistema de flujo pulsátil para esófago de ingeniería**

Se resuspendieron 92 millones de CML de perro de P2 y P3 en 5 ml de medio y se sembraron en el constructo PGA dentro del biorreactor. La construcción sembrada se cultivó dentro del biorreactor conectando a una bomba peristáltica, lo que crea una tensión radial cíclica del 3,0% a 1,5 Hz. El esófago de ingeniería se cultivó en el cultivo pulsátil durante 10 semanas y se mantuvo con 1,3 l de medio de Eagle modificado de Dulbecco con bajo contenido de glucosa con 20% de FBS, factor de crecimiento de fibroblastos básico (10 ng/ml), factor de crecimiento derivado de plaquetas (10 ng/ml), ácido L-ascórbico, sulfato de cobre, HEPES, L-prolina, L-alanina, L-glicina y penicilina G (figura 4). La mitad del volumen del medio se cambió 1,5 veces por semana y el ácido ascórbico se complementó tres veces por semana.

EJEMPLO DE REFERENCIA 6

55 **Descelularización del esófago de ingeniería**

El esófago de ingeniería se cortó en dos trozos de 3 cm de longitud y se incubaron en primer lugar en 250 ml de tampón CHAPS (CHAPS 8 mM, NaCl 1 M y EDTA 25 mM en PBS) durante bien 45 o bien 80 minutos a 37°C con agitación de alta velocidad, seguido de enjuague minucioso de PBS estéril. Las piezas de esófago de ingeniería se trataron adicionalmente con 250 ml de tampón de dodecilsulfato de sodio (SDS) (SDS 1,8 mM, NaCl 1 M y EDTA 25 mM en PBS) durante 45 u 80 minutos a 37°C con agitación a alta velocidad. Las piezas de esófago de ingeniería se lavaron posteriormente con PBS durante dos días para eliminar completamente el detergente residual. Todas las etapas de descelularización se llevaron a cabo en condiciones estériles. Las piezas de esófago de ingeniería descelularizadas se almacenaron en PBS estéril que contenía penicilina 100 U/ml y estreptomina 100 mg/ml a 4°C.

EJEMPLO DE REFERENCIA 7

Retención de la sutura del esófago de ingeniería

5 Se cuelgan pesos de una línea de sutura enhebrada sobre un lado del esófago de ingeniería, a 2,5 a 3 mm del borde. Se añaden gradualmente pesos a la sutura hasta que la sutura se separa del tejido. El peso total al que se rasga el tejido se registra en unidades de gramo.

EJEMPLO DE REFERENCIA 8

10

Tráquea de ingeniería para su implantación en un receptor de rata y resultados de las implantaciones

15 Se reviste un estent metálico de 4 mm de diámetro con una estructura de PGA, se esteriliza y se siembra con células musculares lisas vasculares humanas. La estructura de estent-estructura-células se cultiva dentro de un biorreactor durante un período de 6-10 semanas en presencia de un medio de cultivo de nutrientes. Se sembraron 2×10^6 P2 células musculares lisas humanas (CML) sobre las construcciones de estructura (malla de ácido poliglicólico envuelta alrededor de un estent de nitinol de 4 mm de diámetro) con 4 mm de diámetro y 8 mm de longitud. Las tráqueas se suspendieron estáticamente en tubos de silicona y se cultivaron dentro del biorreactor durante 10 semanas. El medio del biorreactor estaba compuesto por DMEM (alto contenido de glucosa), bFGF (5 ng/ml), EGF (0,5 ng/ml), ácido láctico (0,5 g/l), insulina (0,13 U/ml), Pen G 100 U/ml, solución de prolina/glicina/alanina, CuSO_4 (3 ng/mf) y vitamina C (50 ng/ml). Las tráqueas se cultivaron en 400 ml de medio en todo momento y solo la mitad del medio se sustituyó durante cada cambio de medio. El medio biorreactor se cambió 1,5-2 veces por semana y la vitamina C se complementó al cultivo 3 veces por semana. Se añadió ácido láctico nuevo al medio una vez por semana. Las tráqueas se cultivaron en suero humano al 20% durante las primeras 4 semanas. A partir de la 5ª semana, las tráqueas se cultivaron con un 10% de suero humano.

20 Después del cultivo, el conducto se descelulariza y se almacena en condiciones estériles en solución salina tamponada con fosfato a 4°C. Después de varias semanas de almacenamiento, el conducto se implanta en un receptor de rata desnuda. El pecho de una rata desnuda de 205 g se afeitó con una cuchilla de afeitar. Se realizó una incisión de 2,5 cm desde la región del cuello con un par de tijeras quirúrgicas. El músculo y los tejidos circundantes se separaron capa por capa hasta que se expuso la tráquea. Se eliminó un segmento circunferencial completo de la tráquea que constituye dos anillos cartilagosos. Debido a la liberación de la tensión, la brecha se expandió a aproximadamente 1 cm (dependiendo de los animales individuales). Se colocó una tráquea de 8 mm en la brecha y se anastomosó de extremo a extremo a la tráquea nativa con, como mínimo, 4 suturas de Prolene 6-0 interrumpidas para cada extremo. Finalmente, el músculo y los tejidos circundantes se cosieron juntos con suturas capa por capa.

30 En la extirpación después de 2 o 6 semanas de implante, la tráquea de ingeniería queda repoblada con células epiteliales del huésped en el lumen de la vía aérea. Durante el tiempo de implantación, ningún animal fue tratado con antibióticos. La tráquea implantada también queda repoblada con otras células huésped, incluidos los fibroblastos, y también se repuebla de microvasculatura del huésped tanto en la pared de la tráquea de ingeniería como en el lumen de la tráquea de ingeniería. La densa y rápida afluencia de la microvasculatura (vista tan pronto como 2 semanas después de la implantación, por evaluación histológica) ayuda frente a la resistencia a la infección, ya que los leucocitos del huésped pueden acceder fácilmente al tejido implantado para combatir cualquier organismo infectante. A más largo plazo, la tráquea modificada también puede repoblarse con células cartilaginosas de la tráquea nativa, así como con células musculares lisas que ocupan la pared traqueal nativa y otras vías respiratorias. Todas las tráqueas implantadas resistieron la dilatación, la ruptura y la perforación, lo que podría provocar el fallo del dispositivo y la infección en el animal. Además, las tráqueas implantadas de ingeniería no mostraron ninguna evidencia de rechazo inmune, ni de infección bacteriana o por hongos, durante todo el período de implantación. La tráquea implantada puede resistir la estenosis o la cicatrización que limita el flujo de aire a los pulmones.

40 Las tráqueas de ingeniería humanas descelularizadas se extrajeron de los receptores de ratas a las dos y seis semanas. Después de dos semanas de implantación, se observó una sólida formación de tejido en el lumen de las tráqueas de ingeniería, con evidencia de microvascularización extensa. Además, después de dos semanas, se realizó inmunotinción del tejido luminal y fue muy positivo para la citoqueratina-14, un marcador epitelial. Véase las figuras 17 y 18.

50 Después de 6 semanas de implantación, las tráqueas de ingeniería mostraron una buena incorporación en los tejidos del huésped, con formación de tejido fibroso que rodea la tráquea implantada, alguna evidencia de una matriz humana descelularizada residual, así como crecimiento interno del tejido luminal. También hubo algunas pruebas de infiltración de células huésped en la matriz previamente acelular del implante traqueal. La tráquea de ingeniería implantada estaba físicamente intacta, sin evidencia de distensión, perforación o ruptura anastomótica. No se observó evidencia de infiltración o infección excesiva de leucocitos en las muestras extirpadas. Véase la figura 19.

65 En general, estos resultados muestran que la producción de tráqueas descelularizadas y de ingeniería es factible. Las tráqueas de ingeniería pueden ser suturadas en las vías respiratorias del receptor y pueden conducir el aire y

5 permitir que el receptor sobreviva por largos períodos de tiempo. Las tráqueas de ingeniería no muestran evidencia de infección después de la implantación, y se repueblan rápidamente de las células y tejidos del huésped y de la microvasculatura después de sólo unas pocas semanas. Las células y el tejido que se infiltran en las tráqueas de ingeniería son muy vasculares y también contienen células que son nativas del sistema respiratorio (epitelio pulmonar). Las tráqueas de ingeniería permanecen mecánicamente robustas y no sufren fallos mecánicos, tales como perforación, dilatación, ruptura o ruptura anastomótica.

EJEMPLO 9

10 **Conductos urinarios**

15 Basados en los procedimientos iniciados por Dahl, Niklason y colegas [6-10], los presentes inventores han desarrollado procedimientos para cultivar tejidos de ingeniería tubulares a partir de células musculares lisas humanas (CML) conservadas que se siembran en un estructura biodegradable y se cultivan en biorreactores. No se recolectan células del receptor para este proceso. Después de 10 semanas de cultivo, los tejidos de ingeniería se componen de CML y la matriz extracelular que han producido, que es principalmente colágeno tipo I. A continuación, estos tejidos se descelularizan, creando un tejido tubular acelular que tiene excelentes características mecánicas (resistencias a la ruptura > 0,27 MPa (2.000 mm de Hg) [10]. Los presentes inventores han ensayado estos tejidos de ingeniería tubulares como injertos arteriovenosos en un modelo de babuino, y han demostrado una excelente función, biocompatibilidad, sin fallos mecánicos ni infección.

TABLA 1:	Resistencia de sutura, g	Presión de explosión, MPa (mm de Hg)
Conducto de 6 mm de diámetro	178 ± 11 (n=37)	0,44 +/- 0,05 (3337 +/- 343) (n=10)
Conducto de 6 mm, almacenado 12 meses en tampón de PBS	170 ± 22 (n=9)	0,35 +/- 0,04 (2651 +/- 329) (n=5)

25 Los presentes inventores creen que los tejidos de ingeniería acelulares mitigarán muchas de las complicaciones asociadas con los conductos ileales. Debido a que los tejidos de la presente invención no están vivos y se repueblan gradualmente con las células huésped, la isquemia del conducto y los fallos mecánicos asociados serán extremadamente improbables. Debido a que los tejidos de la presente invención no absorben activamente los electrolitos, no deberían provocar una acidosis metabólica. Debido a que los conductos de la presente invención no fomentan el crecimiento de bacterias comensales, no deberían desencadenar infecciones recurrentes del tracto urinario. Y debido a que están disponibles en el mercado, se evitarán las complicaciones debidas a la resección intestinal. Los tejidos de ingeniería tubulares acelulares de la presente invención tienen propiedades favorables que pueden hacerlos superiores a los segmentos del intestino delgado para la desviación urinaria. Dado que el conducto urinario de la presente invención está prefabricado con células conservadas y puede almacenarse, no es necesario extirpar un segmento de intestino del paciente, y se evita totalmente la cirugía en el intestino. Dado que el conducto de la presente invención no está vivo, esencialmente no hay riesgo de isquemia tisular después de la implantación. Más bien, las células huésped migran gradualmente hacia la matriz acelular, con la formación de una microvasculatura acorde. Dado que el conducto de la presente invención no absorbe activamente sus contenidos lumenales, se reduce sustancialmente el riesgo de acidosis metabólica hiperclorémica. Y, dado que el conducto de la presente invención no alberga flora intestinal, los riesgos de infecciones recurrentes del tracto urinario deberían reducirse notablemente. Por lo tanto, esencialmente todas las complicaciones comunes asociadas con la utilización de un conducto ileal podrían reducirse u obviarse mediante los tejidos de ingeniería acelulares de la presente invención [11].

45 Aproximadamente se realizan anualmente 10.000 cistectomías en los EE. UU., siendo el cáncer de vejiga la principal indicación. En pacientes con enfermedad T1 resistente a las medidas conservadoras y en pacientes con tumores T2, la extirpación quirúrgica de la vejiga con posible resección de órganos pélvicos asociados sigue siendo la norma de atención contemporánea [12]. Entre otras razones menos comunes para la cistectomía se incluyen vejiga neurogénica (cuando amenaza la función renal), lesión severa por radiación en la vejiga e incontinencia intratable así como síndromes de dolor pélvico crónico en las mujeres. Todas las opciones quirúrgicas disponibles actualmente para la construcción de derivaciones urinarias implican la utilización de un segmento de intestino delgado o grueso (figura 11). Aunque es posible construir reservas de continente más complejas, la mayoría de los pacientes en América del Norte sometidos a cistectomía se reconstruyen utilizando la técnica de conducto ileal [13].

55 Shabsigh [14] informó que a los 90 días de la cirugía, las complicaciones gastrointestinales tuvieron lugar con mayor frecuencia (29%), seguidas de infecciones (25%), complicaciones relacionadas con la herida (15%), complicaciones cardíacas (11%) y genitourinarias (11%). Las anomalías electrolíticas, en particular la acidosis metabólica, tienen lugar en el 70% de los pacientes, aunque frecuentemente tienen una importancia clínica desconocida. Se producen trastornos electrolíticos graves en el 10% de los pacientes con un conducto ileal [3, 5]. La osteomalacia puede dar como resultado la acidosis crónica con la consiguiente liberación de calcio de los huesos. La pielonefritis aguda tiene lugar en el 10-17% de los pacientes con conductos ileales y de colon, y el 4% de los pacientes con conductos ileales mueren de sepsis [15]. El cáncer se presenta en conductos ileales: se han descrito carcinomas anaplásicos y pólipos adenomatosos. La tasa informada de cáncer en los conductos ileales varía del 6 al 29% de todos los pacientes,

aunque los cánceres pueden tardar décadas en desarrollarse [5]. Las complicaciones intestinales tempranas comprenden normalmente fugas anastomóticas, fistulas entéricas, obstrucción intestinal e íleo prolongado [11]. Se ha informado de obstrucción intestinal en, aproximadamente, el 5-10% de los pacientes, la mayoría de los cuales responde bien al tratamiento conservador, mientras que, aproximadamente, el 3% requiere cirugía. La fuga anastomótica intestinal es una complicación potencialmente devastadora, de la que se informa en el 1-5% de los pacientes, lo que puede conducir a la formación de abscesos, peritonitis y sepsis [5].

EJEMPLO 10

10 Conducto urinario

Un conducto urinario se cultiva utilizando células musculares lisas humanas que se cultivan en un tubo de estructura de malla de PGA en un biorreactor, tal como se ha descrito. Después de un período de cultivo de 6 a 10 semanas, el tejido tubular resultante se descelulariza y, a continuación, se almacena en solución salina tamponada con fosfato a 4°C durante un período de varios meses. Posteriormente, se prepara un mono cinomolgo (que es un primate del viejo mundo que está filogenéticamente cerca de los humanos y, por lo tanto, es poco probable que rechace el tejido de ingeniería humano) para la implantación del conducto urinario. Después de la inducción de la anestesia, se realiza una laparotomía y los uréteres de ambos riñones se aíslan y se extirpan de la pared de la vejiga, que se sobrehíla. Los uréteres se anastomosan al conducto urinario, cuyo otro extremo se anastomosa a la pared abdominal para permitir que la orina fluya desde los uréteres, a través del conducto y fuera del cuerpo del animal. Después de completar la implantación, el abdomen se cierra y el animal se recupera de la anestesia. Posteriormente, se observa que el conducto urinario conduce la orina hacia el exterior del cuerpo hacia una bolsa recolectora. No hay evidencia de pérdida de orina hacia el abdomen o desde las anastomosis con la pared abdominal o los uréteres.

Un conducto urinario de ingeniería implantado se puede repoblar en la superficie luminal con epitelio urinario. El conducto urinario implantado se puede repoblar con fibroblastos en la pared del conducto, se puede repoblar con microvasculatura que contribuye a la resistencia a la infección, y se puede repoblar con células musculares lisas similares a la vejiga urinaria. El conducto urinario de ingeniería implantado puede resistir la infección de la flora de la piel y de los organismos del tracto urinario. El conducto urinario de ingeniería implantado puede resistir la cicatrización y la constricción que impedirían el flujo de orina, puede resistir la dilatación que causaría la acumulación de orina en el conducto, puede resistir el retorcimiento y la obstrucción que impedirían el flujo de orina, puede resistir la formación de adhesiones intraabdominales que pueden obstruir el conducto o los tejidos intestinales, y puede resistir la creación de acidosis metabólica hiperclorémica en el animal huésped.

35 Bibliografía

1. Healthcare Cost and Utilization Project, N.I.S., 2007.
2. Konety, B.R., Joyce, G.F., Wise, M., Bladder and upper tract urothelial cancer. *Journal of Urology*, 2007. 177: p. 1636-1645.
3. Gudjonsson, S., Davidsson, T., Mansson, W., Incontinent urinary diversion. *BJU International*, 2008. 102: p. 1320-1325.
4. Konety, B.R., Allareddy, V., Influence of post-cystectomy complications on cost and subsequent outcome. *Journal of Urology*, 2007. 177: p. 280-287.
5. Dahl, D.M., McDougan, W.S., *Campbell-Walsh Urology, 9th Edition: Use of intestinal segments and urinary diversion.*, ed. A.J. Wein, Kavoussi, L.R., Novick, A.C. 2009.
6. Niklason, L.E., Gao, J., Abbott, W.M., Hirschi, K., Houser, S., Marini, R., Langer, R., Functional arteries grown in vitro. *Science*, 1999. 284: p. 489-493.
7. Poh, M., Boyer, M., et al., Blood vessels engineered from human cells. *The Lancet*, 2005. 365: p. 2122-2124.
8. Niklason, L.E., Yeh, A.T., Calle, E.A., Bai, Y., Valentin, A., Humphrey, J.D., Enabling tools for engineering collagenous tissues integrating bioreactors, intravital imaging, and biomechanical modeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010. 107: p. 3335-3339.
9. Dahl, S.L.M., Koh, J., Prabhakar, V., Niklason, L.E., Decellularized native and engineered arterial scaffolds for transplantation. *Cell Transplantation*, 2003. 12: p. 659-666.
10. Dahl, S.L.M., Kypson, A.P., Sawson, J.H., Blum, J.L., Strader, J.T., Li, Y., Manson, R.J., Tente, W.E., DiBernardo, L., Hensley, M.T., Carter, R., Williams, T.P., Prichard, H.L., Dey, M.S., Begelman, K.G., Niklason, L.E., Readily available tissue-engineered vascular grafts. *Science Translational Medicine*, 2010. 3(**publicación electrónica antes de impresión**).
11. Farnham, S.B., Cookson, M.S., Surgical complications of urinary diversion. *World Journal of Urology*, 2004. 22: p. 157-167.
12. Stein, J.P., Improving outcomes with radical cystectomy for high-grade invasive bladder cancer. *World Journal of Urology*, 2006. 24: p. 509-516.
13. Kouba, E., Sands, M., Lentz, A., Wallen, E., Pruthi, R.S., Incidence and riskfactors of stomal complications in patients undergoing cystectomy with ileal conduit urinary diversion for bladder cancer. *Journal of Urology*, 2007. 178: p. 950-954.
14. Shabsigh, A., Korets, R., Vora, K.C., Brooks, C.M., Cronin, A.M., Savage, C., Raj, G., Bochner, B.H., Dalbagni,

- G., Herr, H. W., Donat, S.M., Defining early morbidity of radical cystectomy for patients with bladder cancer using a standardized reporting methodology. *European Urology*, 2009. 55: p. 164-174.
15. Nazarko, L., Urinary tract infection: diagnosis, treatment and prevention. *British Journal of Nursing*, 2009. 18: p. 1170-1174.
- 5 16. Longley, J.R., Ravera, J., Riddell, O., Jeter, K., Carbon urinary conduits. Animal experiments. *Investigative Urology*, 1977. 15: p. 59-64.
17. Mansson, W., Harzmann, R., Clinical experience with an alloplastic stoma prosthesis (Biocarbon) for urinary conduits and cutaneous ureterostomy. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*, 1988. 22: p. 223-226.
- 10 18. Basu, J., Guthrie, K., Ilagan, R., Sangha, N., Genheimer, C., Quinlan, S., Payne, R., Rapoport, S., Knight, T., Wagner, B.J., Rivera, E., Jaoy, M.J., Jain, D., Bertram, T.A., Ludlow, J.W., Functional de novo Neo-Urinary Conduit from Porcein peripheral blood and adipose-derived smooth muscle cells., en la 7ª Reunión Anual de la ISSCR. 2009: Barcelona, España.
- 15 19. Raya-Rivera, A., Esquilliano, D.R., Yoo, J.J., Lopez-Bayghen, E., Soker, S., Atala, A., Tissue-engineered autologous urethras for patients who need reconstruction: an observational study. *Lancet*, 2011. Mar 7 (publicación electrónica antes de impresión).
- 20 20. El-Kassaby, A.W., Retik, A.B., Yoo, J.J., Atala, A., Urethral stricture repair with an off-the-shelf collagen matrix. *Journal of Urology*, 2003. 169: p. 170-173.
21. Bodin, A., Bharadwaj, S., Wu, S., Gatenholm, P., Atala, A., Zhang, Y., Tissue-engineered conduits using urinederived stem cells seeded bacterial cellulose polymer in urinary reconstruction and diversion. *Biomaterials*, 2010. 31: p. 8889-8901.
22. Hipp, J., Andersson, K.E., Kwon, T.G., Kwak, E.K., Yoo, J., Atala, A., Microarray analysis of exstrophic human bladder smooth muscle. *BJU International*, 2008. 101: p. 100-105.
23. Kim, B.S., Atala, A., Yoo, J.J., A collagen matrix derived from bladder can be used to engineer smooth muscle tissue. *World Journal of Urology*, 2008. 26: p. 307-314.
- 25 24. Tian, H., Bharadwaj, S., Liu, Y., Ma, P.X., Atala, A., Zhang, Y., Differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells into bladder cells: potential for urological tissue engineering. *Tissue Engineering Part A*, 2010. 16: p. 1769-1779.
25. Dahl, S.L.M., Kypson, A.P., Sawson, J.H., Blum, J.L., Strader, J.T., Li, Y., Manson, R.J., Tente, W.E., DiBernardo, L., Hensley, M.T., Carter, R., Williams, T.P., Prichard, H.L., Dey, M.S., Begelman, K.G., Niklason, L.E., Readily available tissue-engineered vascular grafts. *Science Translational Medicine*, 2011. (publicación electrónica antes de impresión).
- 30 26. Backhaus, B.O., Kaefer, M., Haberstroh, K.M., Hile, K., Nagatomi, J., Rink, R.C., Cain, M.P., Casale, A., Bizios, R., Alterations in the molecular determinants of bladder compliance at hydrostatic pressures less than 40 cm water. *Journal of Urology*, 2002. 168: p. 2600-2604.
- 35 27. Hiles, M.C., Badylak, S.F., et al., Porosity of porcine small-intestinal submucosa for use as a vascular graft. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1993. 27: p. 139-144.
28. Niklason, L.E., Abbott, W.A., Gao, J., Klagges, B., Hirschi, K.K., Ulubayram, K., Conroy, N., Jones, R., Vasanawala, A., Sanzgiri, S., Langer, R., Morphologic and mechanical characteristics of bovine engineered arteries. *Journal of Vascular Surgery*, 2001. 33: p. 628-638.
- 40 29. Woessner, J.F., The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this amino acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1961. 93: p. 440-447.
30. Taguchi, T., Ikoma, T., Tanaka, J., An improved method to prepare hyaluronic acid and type II collagen composite matrices. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2002. 61: p. 330-336.
- 45 31. Stegman, S.J., Chu, S., Bensch, K., Armstrong, R., A light and electron microscopic evaluation of Zyderm collagen and Zyplast implants in aging human facial skin. A pilot study. *Archives Dermatology*, 1987. 123: p. 1644-1649.
32. Spindel, E., Pauley, M., Jia, Y., Gravett, C., Thompson, S., Boyle, N., Ojeda, S., Norgren, R., Leveraging human genomic information to identify nonhuman primate sequences for expression array development. *BMC Genomics*, 2005. 6: p. 160.

REIVINDICACIONES

1. Conducto urinario artificial con estent, para la implantación en un paciente que necesita desviación urinaria y drenaje, que comprende:
- 5 una matriz extracelular tubular, sustancialmente acelular, de un solo tejido formada como un tubo, en la que la matriz extracelular se ha producido y se ha secretado por células de músculo liso no autólogas sobre un sustrato tubular, en el que el conducto urinario artificial comprende un estent tubular, en el que el estent tubular está envuelto y revestido dentro de la matriz extracelular de tejido único, y en el que las superficies interna y externa de la matriz
- 10 extracelular de tejido único, se fijan por rotación una respecto al otro, y en el que el conducto urinario tiene una resistencia a la rotura superior a 0,13 MPa (1.000 mm de Hg).
2. Conducto urinario artificial, según la reivindicación 1, que tiene una resistencia de retención de sutura mayor de 150 gramos.
- 15 3. Conducto urinario artificial, según la reivindicación 1, en el que la matriz extracelular no está en capas.
4. Conducto urinario artificial, según la reivindicación 1, que tiene un diámetro entre 6 y 25 mm.
- 20 5. Conducto urinario artificial, según la reivindicación 1, que tiene un diámetro superior a 10 mm.
6. Conducto urinario artificial, según la reivindicación 1, en el que las células de músculo liso no autólogas son humanas.
- 25 7. Conducto urinario artificial, según la reivindicación 1, en el que las células de músculo liso no autólogas son células humanas conservadas.

Fig. 1

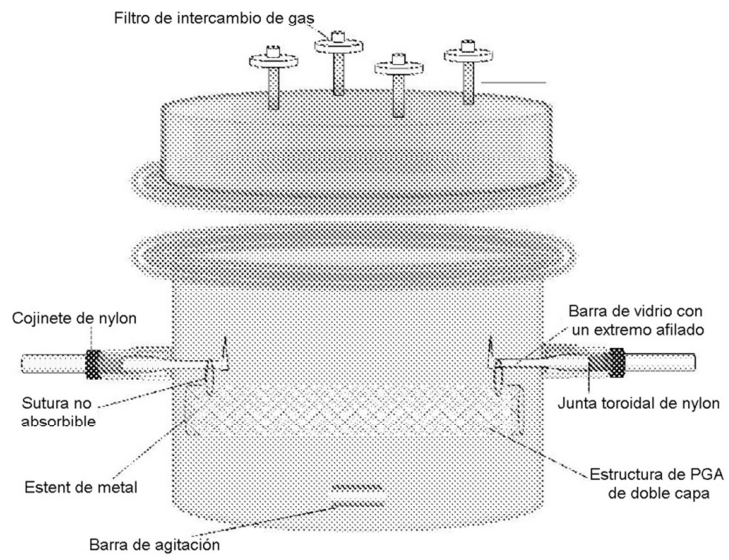


Fig. 2

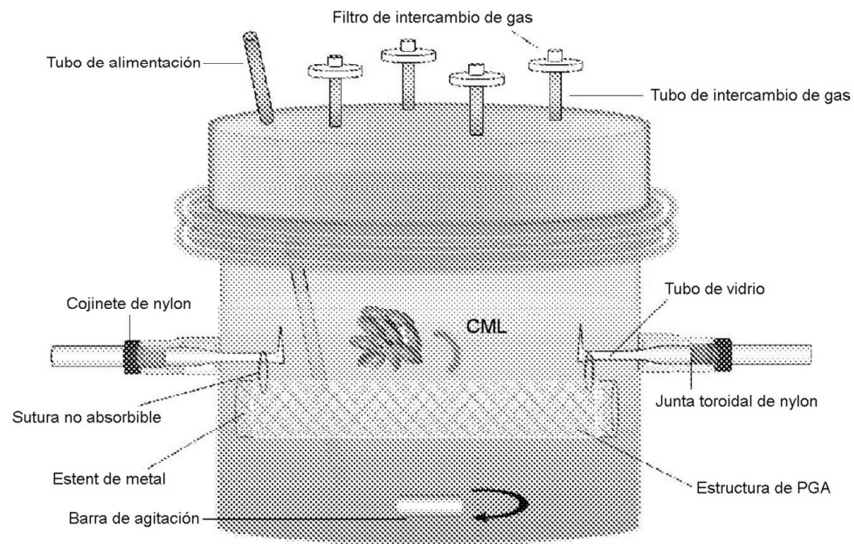


FIG. 3A y 3B

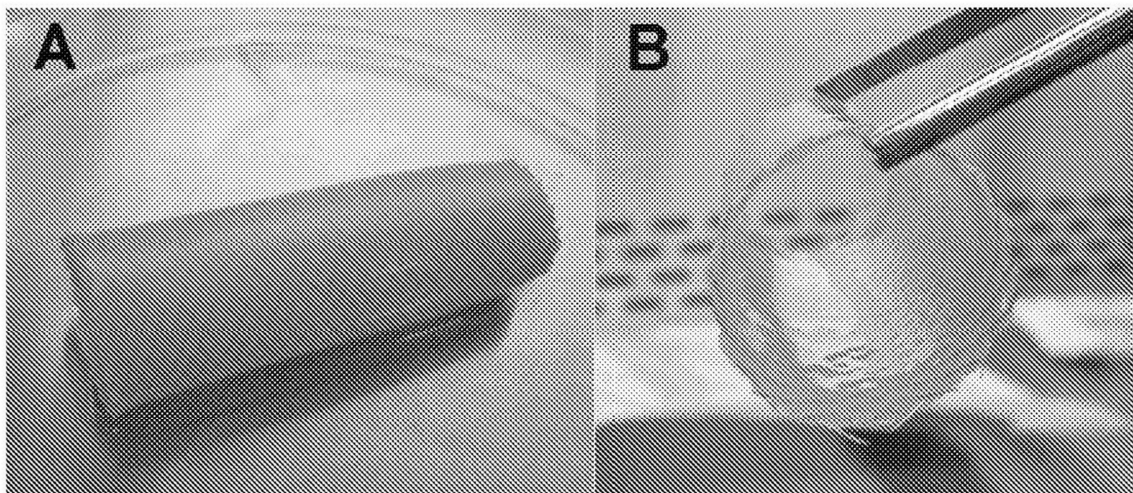


FIG. 4.

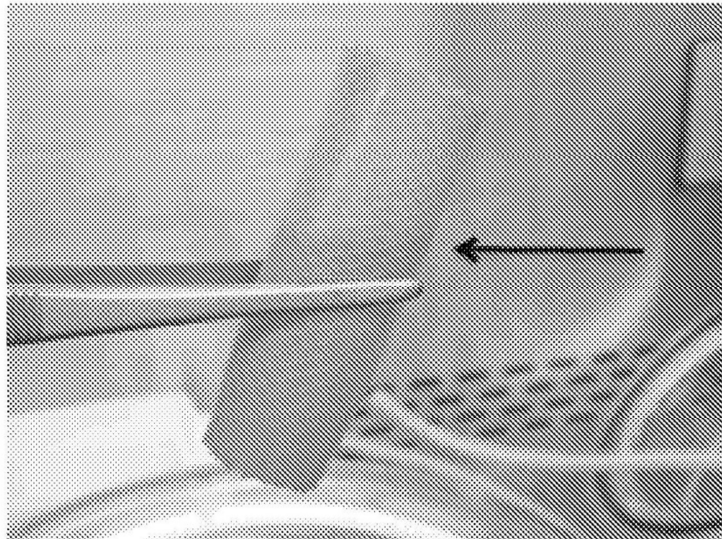


FIG 5.

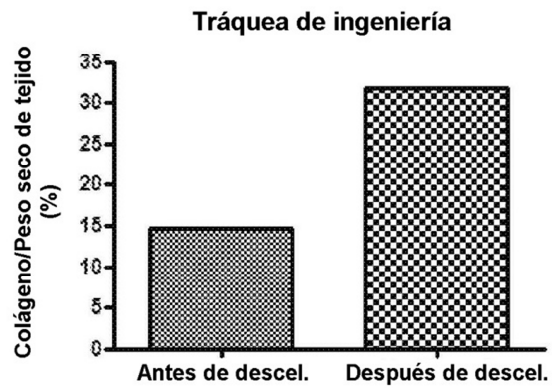


Fig. 6.

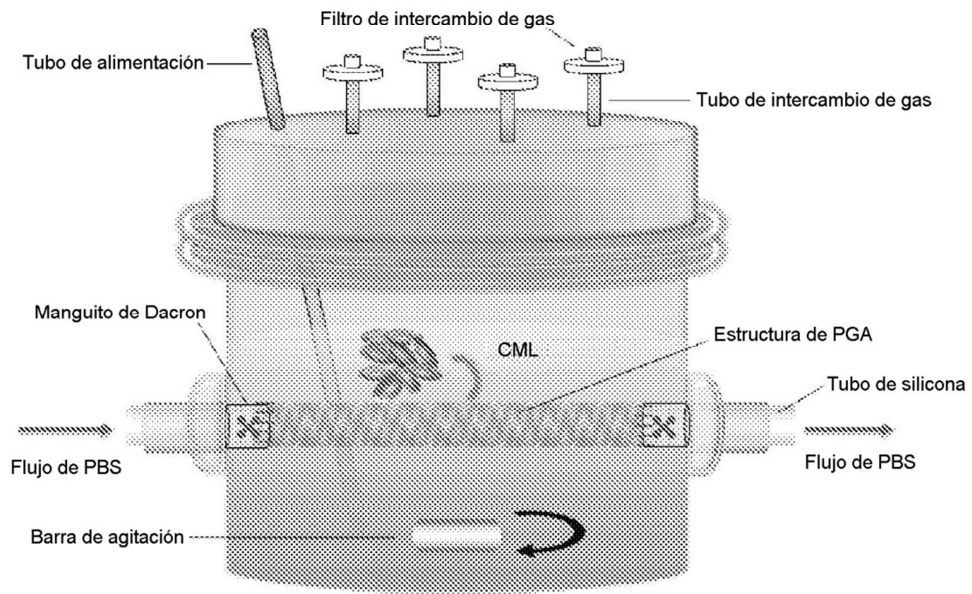


FIG. 7

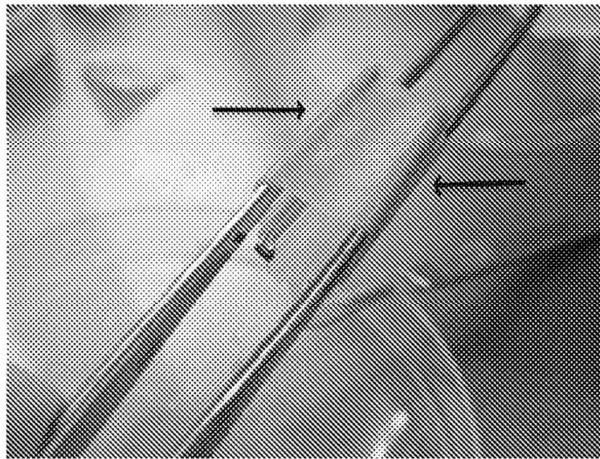


FIG. 8A, 8B, 8C

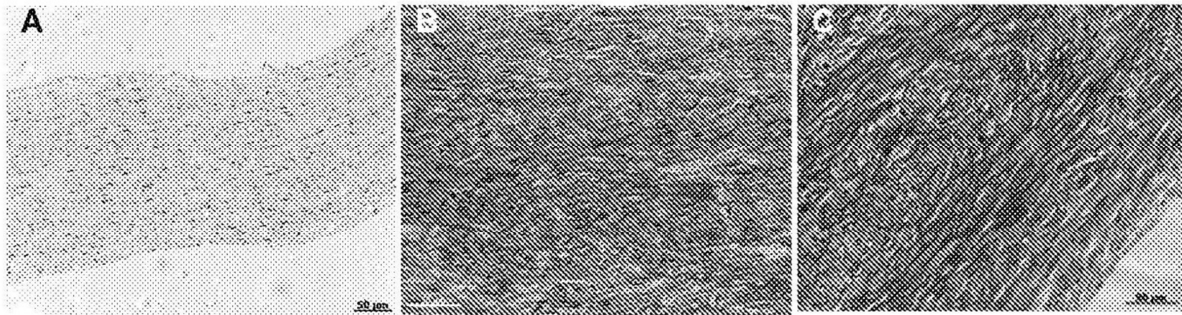


FIG. 9

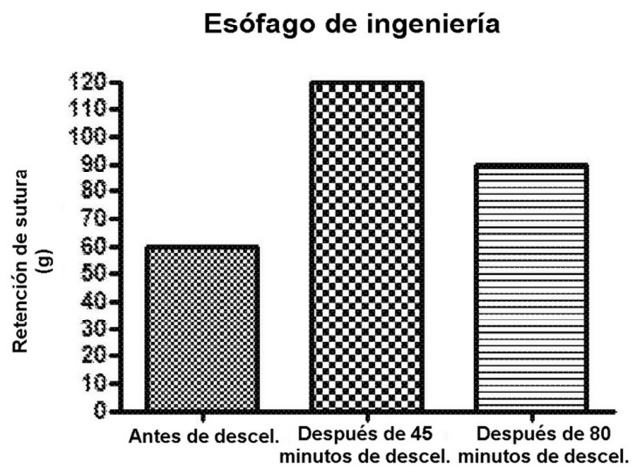


FIG. 10

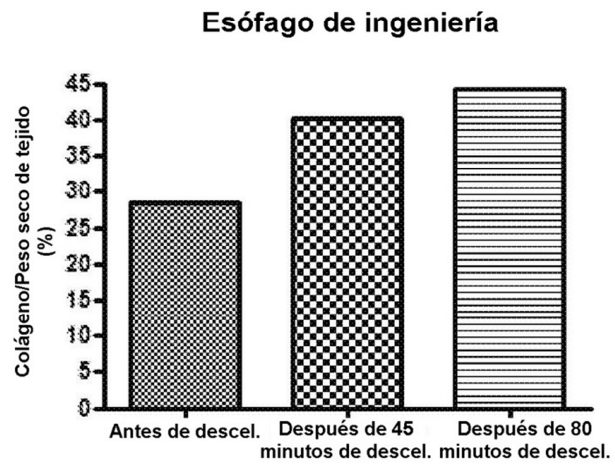


Fig. 11

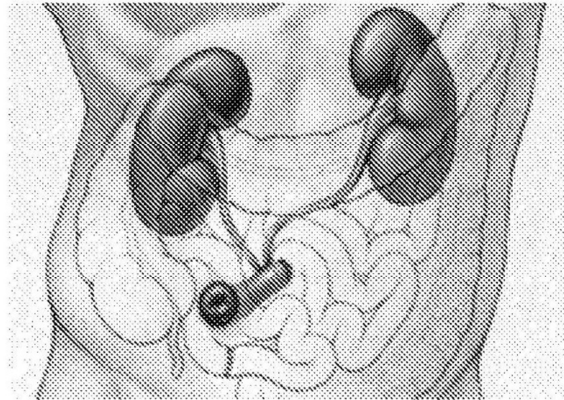


Fig. 12A, 12B, 12C

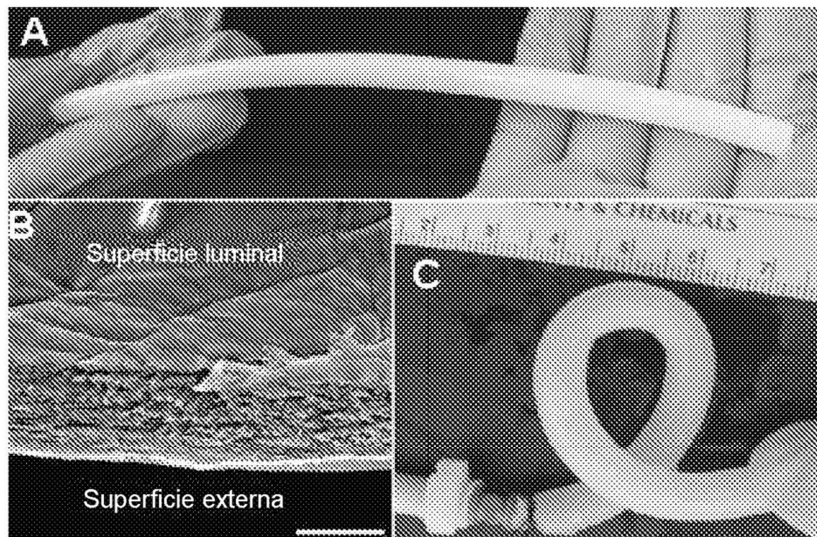
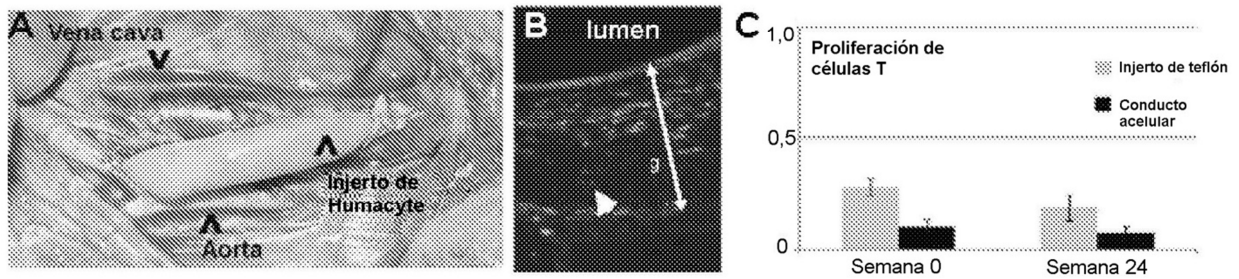
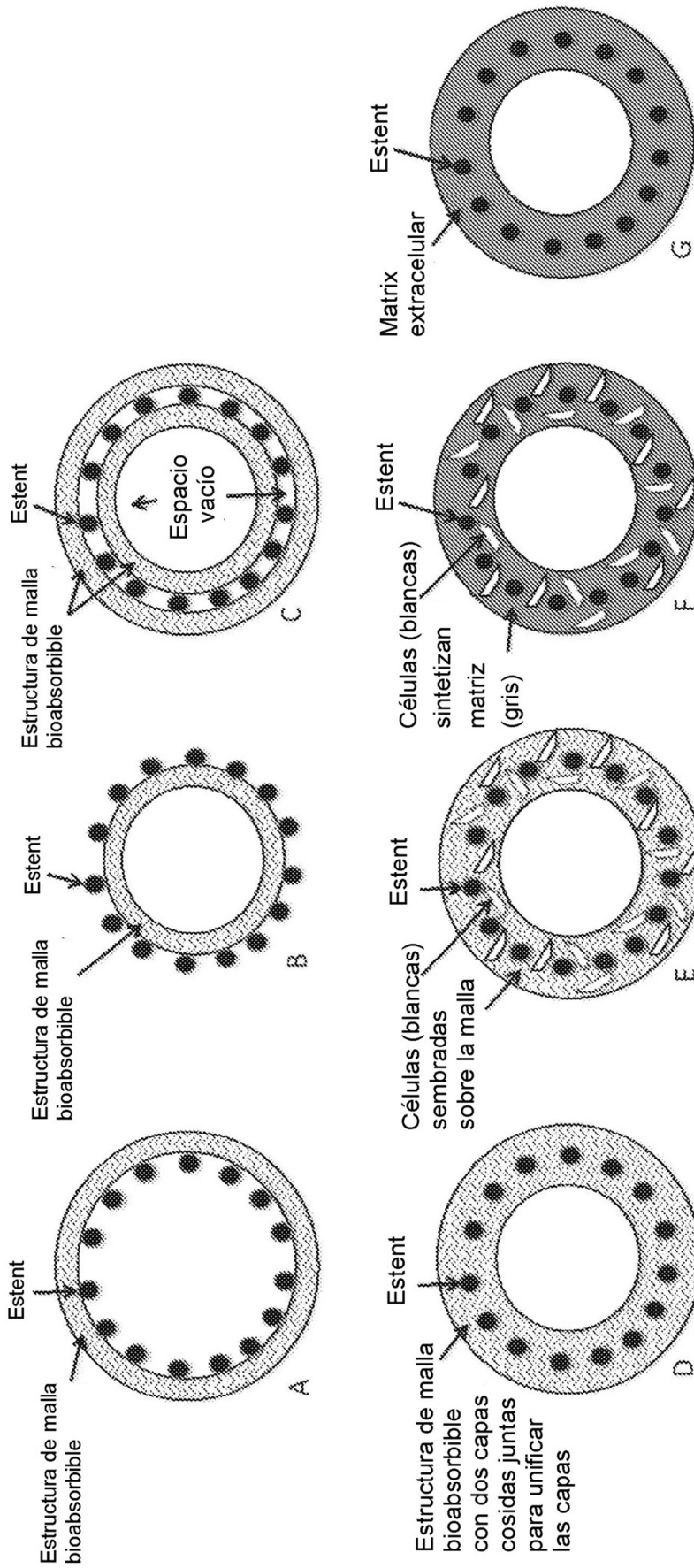


Fig. 13A, 13B, 13C





Figs. 14A-14G

Fig. 15

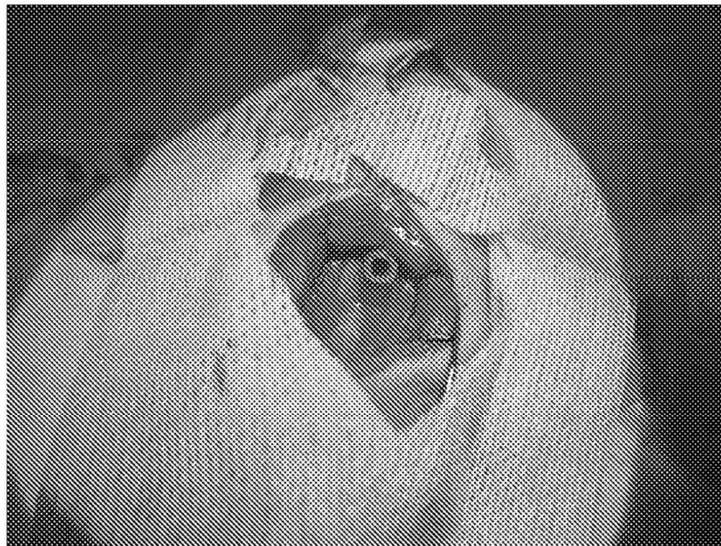


Fig. 16

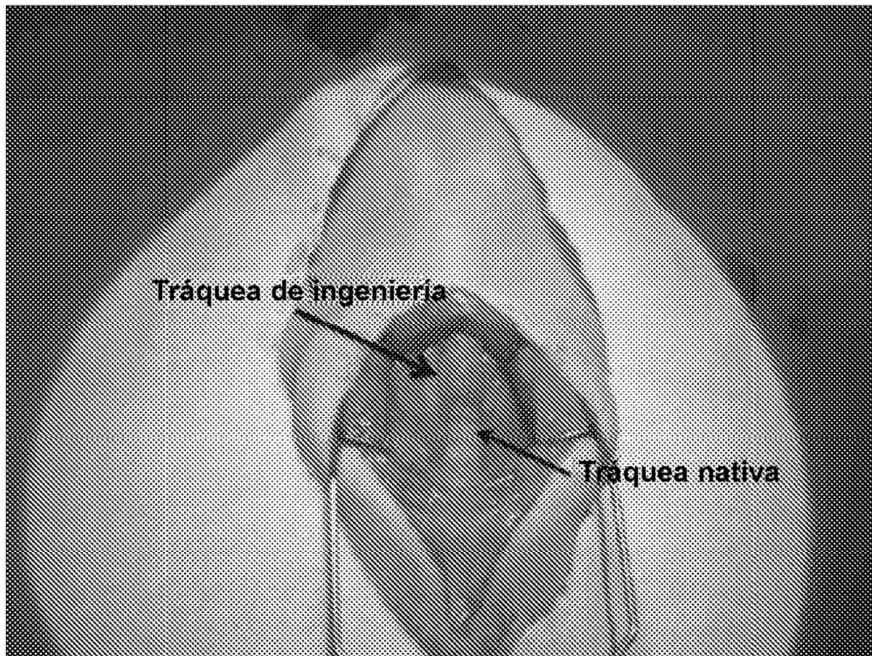


Fig. 17

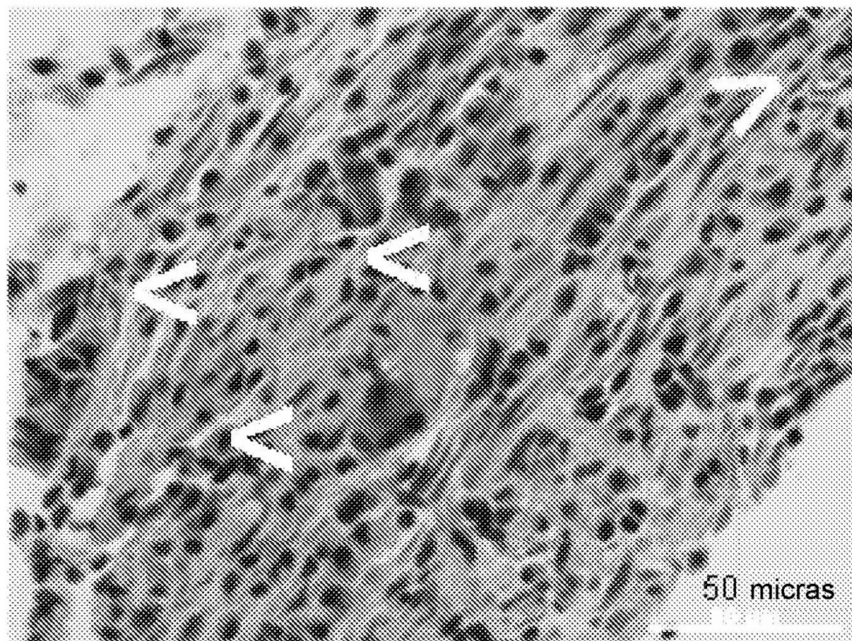


Fig. 18

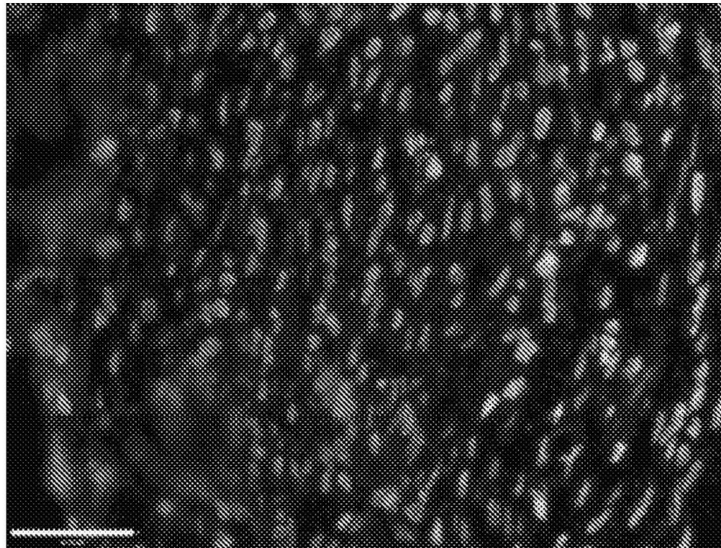
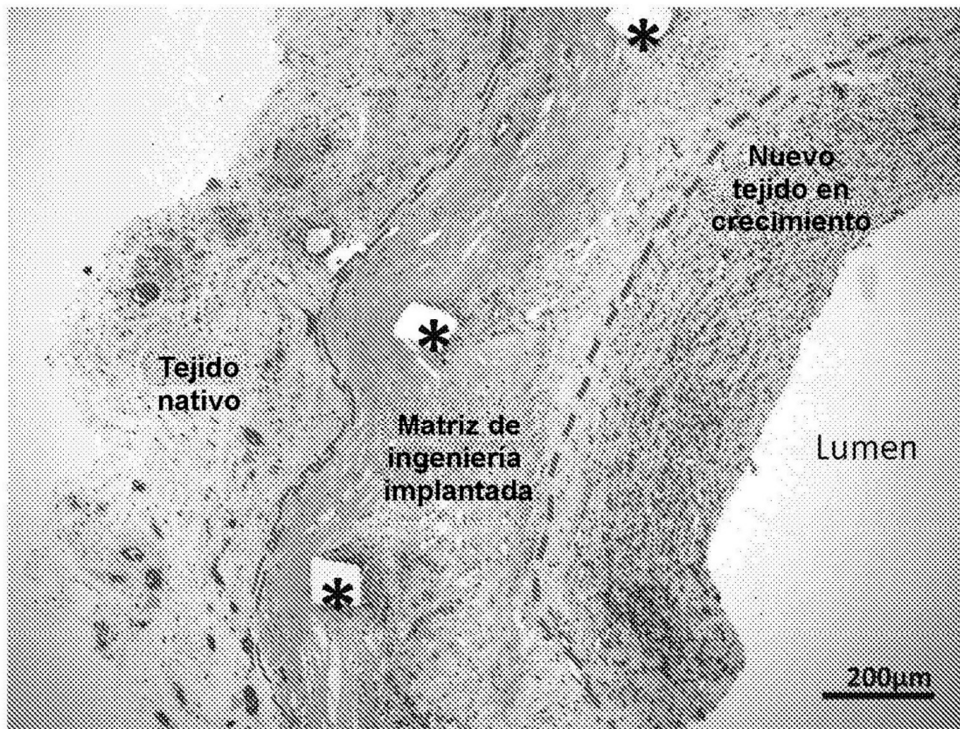


Fig. 19



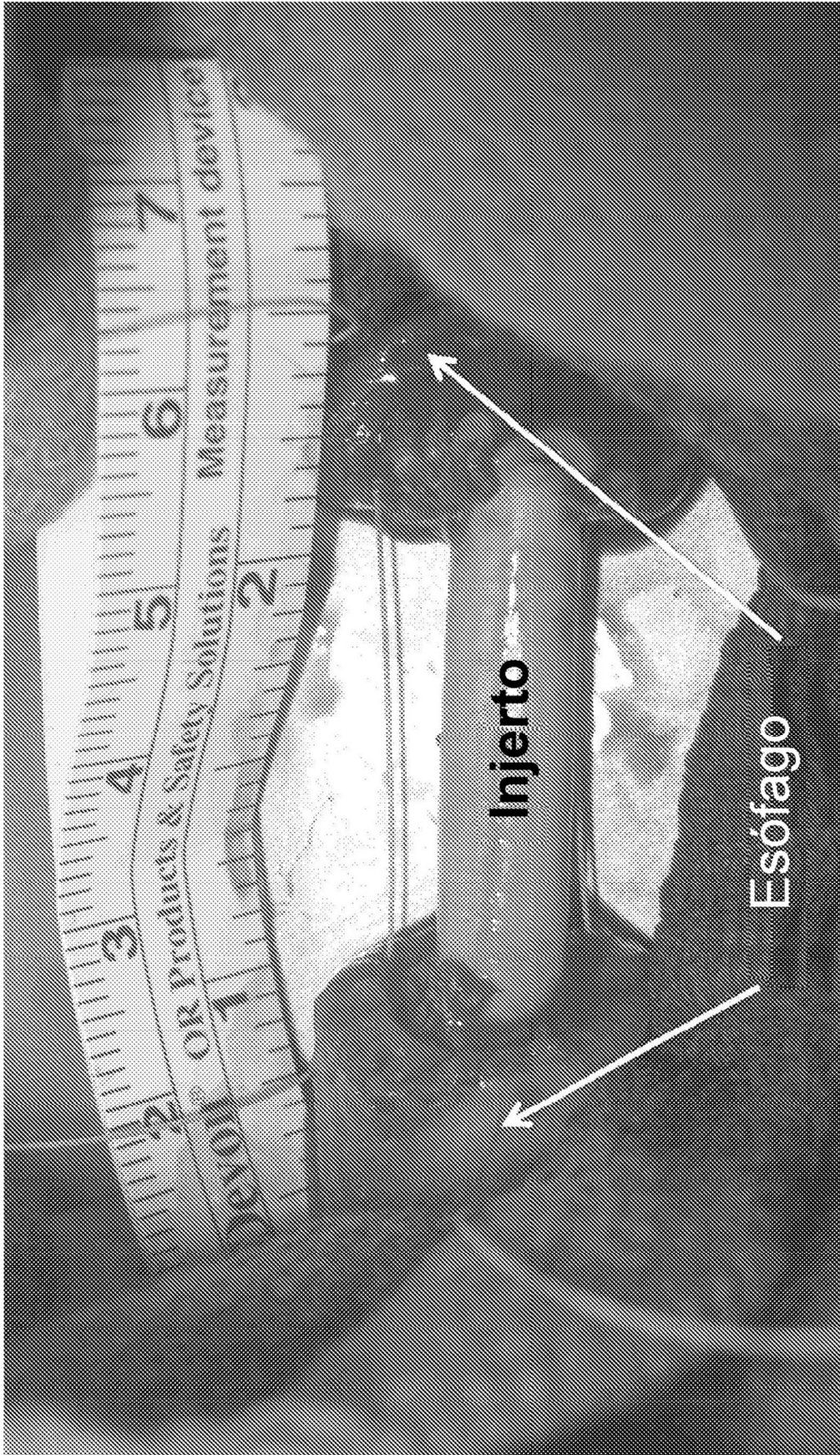


Fig. 20A

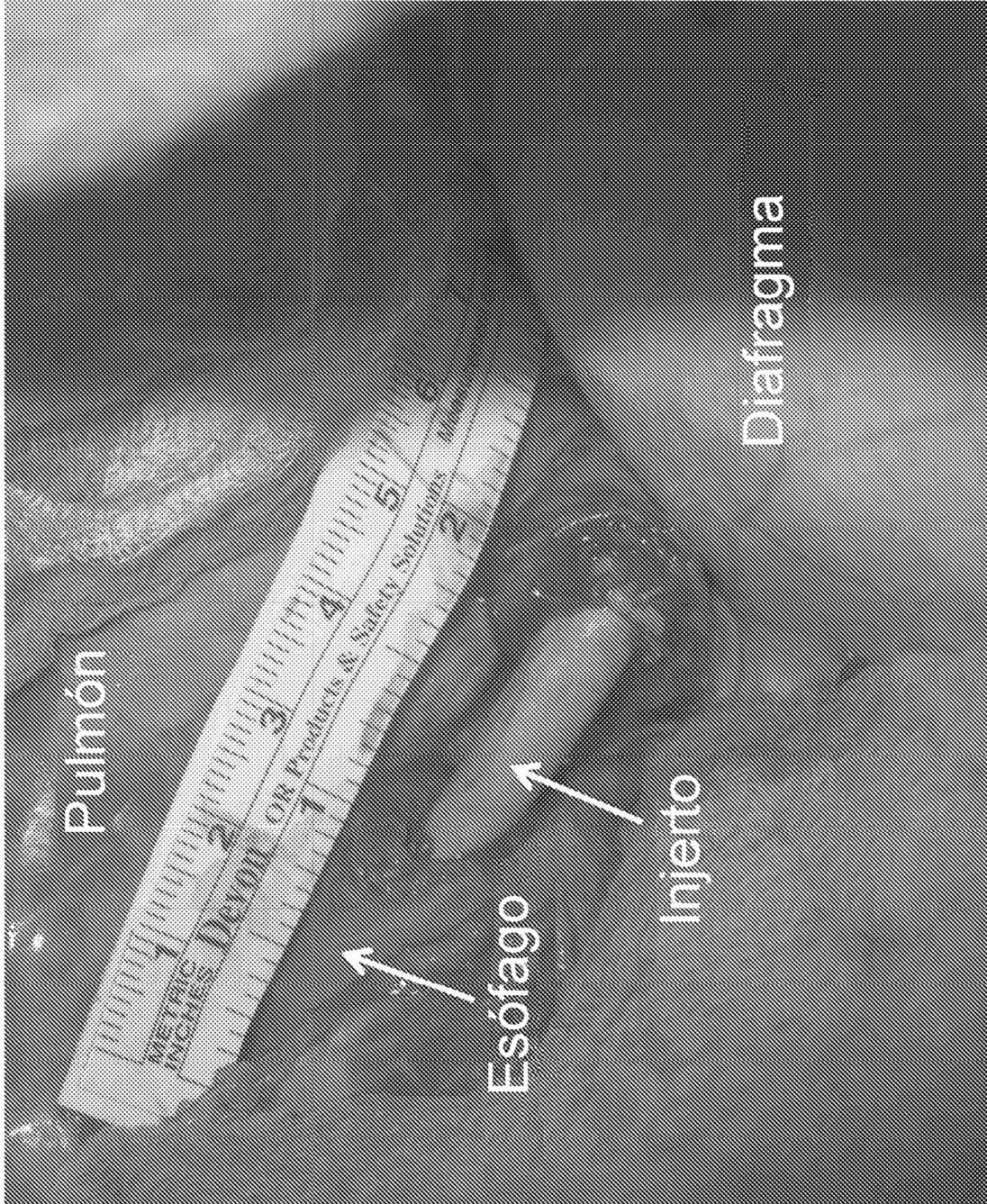


Fig. 20B

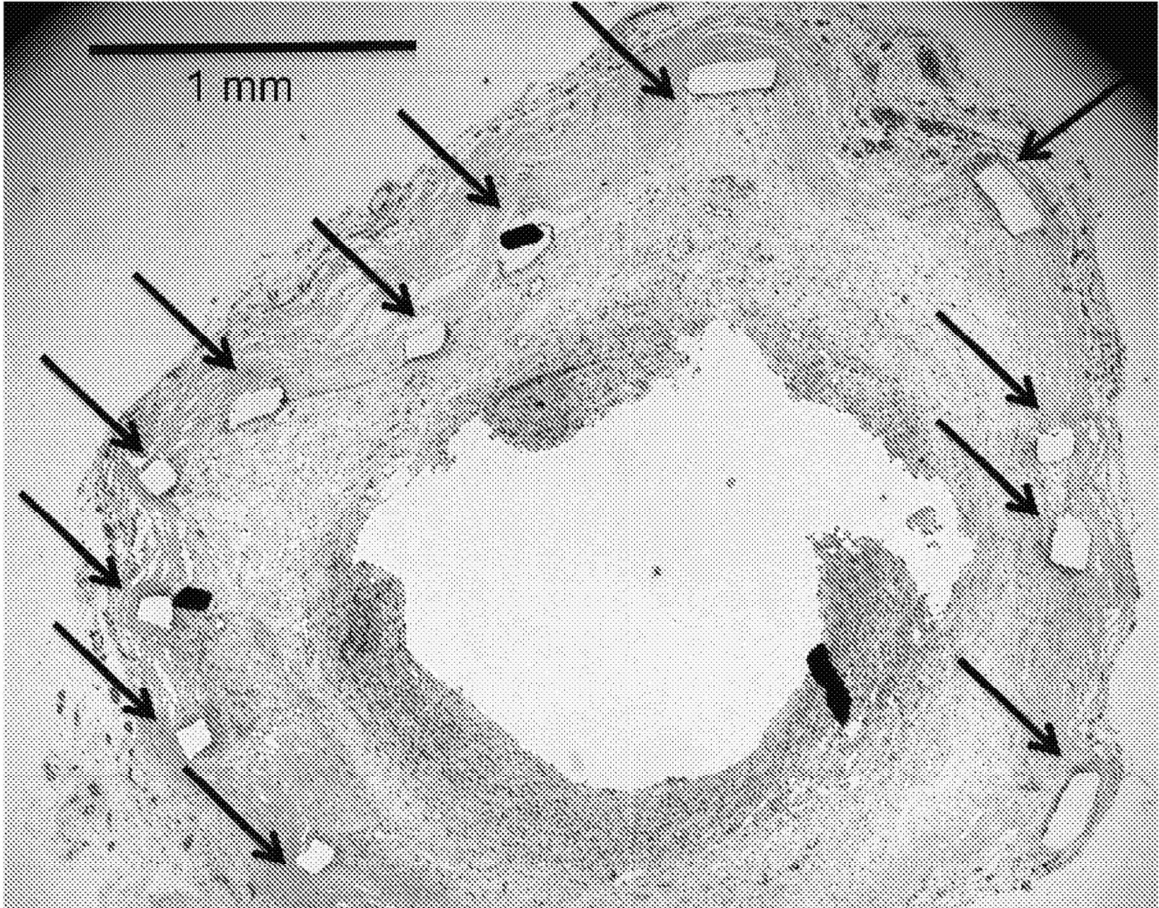


Fig. 21