



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 387**

51 Int. Cl.:
A61F 2/02 (2006.01)
A61L 27/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03767777 .0**
96 Fecha de presentación : **10.12.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1572027**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.09.2005**

54 Título: **Implantes recubiertos de aptámeros que proporcionan adhesión a las células precursoras endoteliales.**

30 Prioridad: **17.12.2002 DE 102 58 924**

73 Titular/es: **Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Universitätsklinikum
Geissweg 3
72076 Tübingen, DE**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.06.2011

72 Inventor/es: **Schlüsener, Hermann y
Wendel, Hans-Peter**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.06.2011

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 360 387 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

implantes recubiertos de aptámeros que proporcionan adhesión a las células precursoras endoteliales

5 La presente invención se refiere a implantes que tienen por lo menos una superficie que entra en contacto con tejidos y/o líquidos del cuerpo humano o animal, que está recubierta por lo menos parcialmente, que proporcionan adhesión a las células precursoras endoteliales, caracterizados porque las sustancias son aptámeros.

Los dispositivos con superficies recubiertas desempeñan un papel importante en especial cuando tales dispositivos están en contacto con tejidos o sangre humanos, como ocurre por ejemplo en el caso de un sistema circulatorio sanguíneo extracorporeal o en el caso de prótesis vasculares.

10 En el caso de circulación sanguínea extracorporeal, que tiene que efectuarse p.ej. en las operaciones a corazón abierto o en las diálisis, la sangre entra en contacto con superficies artificiales, p.ej. de tubos flexibles, bombas, oxigenadores, etc., por lo menos por poco tiempo. Debido a este contacto pueden desencadenarse en la sangre reacciones de coagulación y aglomeración, que pueden provocar entre otras trombosis letales, reacciones inflamatorias y formación de biopelículas (colonización bacteriana). En el caso de sistemas de apoyo cardíaco y/o pulmonar y también en el caso de los catéteres y accesos vasculares es previsible que el contacto se pueda prolongar durante 15 varias semanas. También los sistemas de almacenamiento de componentes de la sangre o p.ej. de lentes de contacto pueden estar en contacto con tejidos humanos o animales durante un largo período de tiempo.

20 Como dispositivos que entran en contacto con la sangre o tejidos humanos se toman en consideración además los implantes que se emplean en el cuerpo humano durante un tiempo o duración determinados. Durante un largo período de tiempo se emplean p.ej. las válvulas artificiales del corazón, las articulaciones artificiales de cadena o rodilla, los marcapasos y los implantes dentales; durante un período transitorio p.ej. las placas y tornillos de material artificial (metal, cerámica, plástico) o de material animal, a ser posible inmunológicamente inerte. Se toman también en consideración las prótesis vasculares, los conductos, los emplastos, las vejigas artificiales, etc., que en principio pueden fabricarse con cualquier sustancia polimérica, metálica, aleaciones, textiles, productos naturales (quitosano, celulosa bacteriana, etc.) o también con otros materiales degradables.

25 Además, en la cirugía vascular se emplean a menudo prótesis, p.ej. en forma de prótesis endovasculares (stents), dichas prótesis pueden fabricarse con diversos plásticos o metales. Dado que son estructuras ajenas al cuerpo, se observan a menudo reacciones inflamatorias, el encapsulado de la estructura ajena por proliferación del tejido circundante como reacción de rechazo, así como complicaciones en la coagulación de la sangre y la restenosis.

30 No solo en las aplicaciones mencionadas existe la necesidad de recubrir las superficies de modo que tengan una buena biodisponibilidad con respecto a la sangre o con otras partes de los tejidos. La biocompatibilidad significa en sentido lato la compatibilidad de las sustancias con el material biológico vivo (huesos, tejidos, sangre, órganos, etc.). Para evitar complicaciones como son la coagulación, proliferación, reacciones inflamatorias y reacciones de rechazo, actualmente se recubren los dispositivos, que entran en contacto con la sangre, tejidos, etc., con materiales biocompatibles. Los materiales empleados actualmente deberán tener un comportamiento inerte y no influir de modo 35 apreciable en el metabolismo.

40 En el estado de la técnica se conocen p.ej. la estrategia de colonizar "in vitro" los implantes con células propias del paciente. En el marco de esta estrategia se preparan y cultivan "in vitro" tejidos autólogos y en combinación con matrices apropiadas se genera un implante "adaptado" al paciente. Después se aloja este implante en el cuerpo del dador y madura en el receptor para convertirse en un tejido lo más natural posible. De este modo se pretende evitar que el cuerpo detecte los implantes como ajenos y los rechace.

45 El inconveniente de la fabricación de los implantes, que se colonizan "in vitro" mediante la técnica llamada "ingeniería de tejidos" (tissue engineering), consiste en que la colonización de tales implantes o dispositivos tiene que realizarse de modo muy laborioso y en condiciones extremadamente estériles, con el fin de lograr resultados suficientemente buenos. Para preparar estos dispositivos implantables tienen que aislarse en primer lugar células del paciente, al que se pretende aplicar un implante de este tipo. A continuación tienen que cultivarse las células sobre el implante en cuestión y multiplicarse, finalmente tiene que introducirse el implante en el cuerpo del paciente mediante una operación quirúrgica. Los pasos mencionados hacen que este procedimiento requiera una extraordinaria dedicación de tiempo (personal) y por tanto sea muy caro.

50 Además se constata a menudo que las células de la superficie de los implantes se han multiplicado, pero que al mismo tiempo debido a la desdiferenciación han perdido muchas propiedades. Por ejemplo, las células de cartílago aisladas apenas generan sustancia de cartílago o generan una sustancia de cartílago atípica. Las células de epitelio intestinal o de túbulos renales no son capaces de absorber sustancias del modo ya conocido y realizan funciones notablemente reducidas de transporte y estanqueidad.

En el estado de la técnica se conoce además el modo de proporcionar adhesión de las células sobre una superficie recubierta con estos péptidos/proteínas gracias a péptidos o proteínas que se fijan sobre células.

En la bibliografía científica se describe en especial la utilización de péptidos específicos de integrina o de derivados de laminina para el recubrimiento de implantes (véase p.ej. Kantlehner y col., "Surface coating with cyclic RGD peptides stimulates osteoblast adhesion and proliferation as well as bone formation", *Chembiochem* **18**, 107-114, 2000; Tamura y col., "Coating of titanium alloy with soluble laminin-5 promotes cell attachment and hemidesmosome assembly in gingival epithelial cells: potential application to dental implants", *J. Periodontal Res.* **32** (3), 287-294, 1997; Kaushal S. y col., "Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded t", *Nat. Med.* **7**(9) 1035-1040, 2001).

10 En el documento DE 197 55 801 se describen también implantes, que contienen péptidos para la estimulación específica de la adhesión de células corporales y que contienen secuencias que reconocen los sitios de unión con los receptores de integrina de las células. Estos péptidos están dispuestos formando una estructura determinada en la superficie del implante.

15 Sin embargo, la utilización de péptidos tiene el inconveniente de que estos son muy costosos por su construcción y síntesis, de ello resulta que también es muy laboriosa y cara la fabricación de los dispositivos recubiertos con estos péptidos.

20 Vistos los antecedentes, el objetivo de la presente invención consiste en desarrollar una sustancia que proporcione adhesión al material biológico, que pueda fabricarse de modo económico y sin gran dedicación de tiempo (personal), que dichos dispositivos tengan al mismo tiempo buenas propiedades biocompatibles y puedan colonizarse de forma sencilla con células y/o proteínas.

Según la invención se alcanza el objetivo con el desarrollo de un implante según la reivindicación 1.

Los inventores han advertido que es posible recubrir superficies con aptámeros de modo que gracias a estos aptámeros se puede inmovilizar el material biológico sobre las superficies.

25 Esto ha sido sorprendente además porque en el estado de la técnica se ha descrito la utilización de aptámeros en otro contexto. Por ejemplo, en el documento DE 197 45 668 se describe la utilización de aptámeros para el recubrimiento de un chip de diagnóstico, es decir, para el uso extracorporal. En el documento WO 01/92566 se describe un dispositivo recubierto por aptámeros para la purificación extracorporal de la sangre.

Los aptámeros son oligo- o polinucleótidos muy afines de RNA o DNA, que por su estructura espacial específica poseen una gran afinidad con una molécula diana.

30 Los aptámeros pueden llegar a ser incluso más específicos que los anticuerpos y poseen propiedades de unión a los antígenos similares a las que tienen los fragmentos de anticuerpos. Por su superficie relativamente grande y flexible, pueden interactuar potencialmente con más moléculas diana que las moléculas de menor tamaño.

35 Con el "SELEX" (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) pueden generarse enzimáticamente grandes cantidades de oligonucleótidos de las secuencias y estructuras secundarias más variadas. Después, de este conjunto se sacan los oligonucleótidos que tienen mayor afinidad con una molécula diana y se aumenta su concentración. Si se conoce la estructura primaria de un oligonucleótido de este tipo se podrá sintetizar por métodos químicos. Un ejemplo ilustrativo de obtención de aptámeros apropiados se ha descrito p.ej. en el documento DE 100 19 154.

40 Los aptámeros encontrados pueden modificarse después con técnicas adecuadas, de modo que estén protegidos y no pierdan su eficacia en el medio biológico, no se digieran con las nucleasas. Los mecanismos de protección, apropiados para este fin, ya se conocen suficientemente por el estado de la técnica e incluyen p.ej. las tecnologías LNA (locked nucleic acids) con furanosa (véase Wahlestedt y col., "Patent and nontoxic antisense oligonucleotides containing locked nucleic acids", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**(10), 5633-5638, 2000), o la tecnología Spiegelmer[®] de la empresa Noxxon (Berlín, Alemania).

45 Según la invención pueden prepararse ahora implantes, cuyas superficies están recubiertas por lo menos parcialmente con determinados aptámeros, gracias a los cuales pueden inmovilizarse sobre la superficie las células precursoras endoteliales nativas.

Es ventajoso en este tipo de recubrimiento de aptámeros que este recubrimiento sea estable y esterilizable, con lo cual los implantes, que se recubren con aptámeros, podrán fabricarse de forma económica. Si se comparan con los

péptidos existe otra ventaja adicional el hecho que los péptidos a menudo pierden su actividad con la esterilización, mientras que los oligonucleótidos, es decir, los aptámeros, son extraordinariamente estables.

5 No siempre es necesario recubrir todas las superficies de los implantes, sino que en muchos casos puede ser deseable recubrir solo determinadas superficies de los implantes con los aptámeros o diferentes superficies de un implante con diferentes aptámeros. De este modo se puede lograr que las células precursoras endoteliales se unan solamente a las superficies recubiertas con los aptámeros.

10 Esto es ventajoso p.ej. en el caso de los "stents", prótesis vasculares, accesos vasculares, puertos o conductos, cuya superficie interior, que entra en contacto p.ej. con la sangre, puede recubrirse de forma diferente a la superficie exterior, que está en contacto con el tejido que rodea al "stent" (prótesis endovascular) y que tiene que crecer en el interior de dicho tejido.

En los implantes recubiertos de la invención tiene lugar la fijación de las células precursoras endoteliales de la sangre, tejidos, órganos u otras fuentes, con lo cual se logra la generación de superficies límite, capas, conjuntos celulares funcionales autólogos, que de este modo el cuerpo ya no los detecta como ajenos y asumen las propiedades fisiológicas funcionales del correspondiente lugar u órgano de utilización.

15 En una forma preferida de ejecución, los aptámeros son moléculas de ácido nucleico que contienen por lo menos una de las secuencias de SEQ ID NO 1 a SEQ ID NO 17 del listado de secuencias adjunto.

20 Los inventores han podido demostrar con sus propios ensayos que las células precursoras endoteliales nativas contienen moléculas de ácido nucleico, que contienen por lo menos una de las anteriores secuencias de nucleótidos, que según han podido reconocer los inventores se caracterizan por un gran afinidad con las células precursoras endoteliales.

Es preferido además que la molécula de ácido nucleico sea una molécula de ácido nucleico que tiene una de las secuencias de nucleótidos de la SEQ ID NO 1 a la SEQ ID NO 17 del listado de secuencias adjunto.

Las moléculas de ácido nucleico que tienen las secuencias publicadas han demostrado ser especialmente idóneas para fijarse sobre células precursoras endoteliales.

25 Es preferido que los aptámeros se integren en la superficie del implante ya sea directamente, ya sea a través de una molécula de engarce (linker).

Se entiende por "molécula de engarce" o "engarce" cualquier sustancia que sea capaz de integrar un aptámero en la superficie.

30 Es preferido que la molécula de engarce sea el 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo y/o p.ej. un copolímeros de bloques de PEG lineal o de forma de estrella.

35 Se ha podido demostrar del compuesto 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo que se puede utilizar incluso durante la inmovilización de un regulador del sistema de complemento sobre determinadas superficies de los biomateriales (véase Andersson y col., "Binding of a model regulator of complement activation (RCA) to a biomaterial surface: surface-bound factor H inhibits complement activation", *Biomaterials* 22, 2435-2443, 2001). Con el uso de este engarce no resulta mermada la actividad biológica del regulador. Los copolímeros de bloques de PEG, que también han demostrado ser engarces apropiados, se han descrito de forma resumida p.ej. en Tirelli y col., "Poly(ethylene glycol)block copolymers", *Biotechnol.* 90(1), 3-15, 2002.

40 Además, los aptámeros, en principio al igual que todos los nucleótidos (p.ej. después de la condensación con grupos amino o biotina del extremo 3' ó 5') pueden incrustarse en la superficie de los implantes mediante moléculas de engarce o espaciadores apropiados. Se han descrito procedimientos de inmovilización de oligonucleótidos p.ej. en "Inmovilización de oligonucleótidos sobre láminas de silicio con grupos funcionales amino" (U. Haker, tesis doctoral, Hamburgo, 2000), utilizándose en este caso entre otros el diisocianato de 1,4-fenileno. En la tesis doctoral "Analítica de afinidad miniaturizada - Modificaciones superficiales resueltas en el lugar, ensayos y detección" (I. Stemmler, tesis doctoral, Tubinga (Alemania), 1999) y en la publicaciones de Hermanson y col., "Immobilized affinity ligand techniques" (Academic Press, San Diego, 1992) y "Bioconjugate Techniques" (Academic Press, San Diego, 1996) se han descrito otros importantes procedimientos covalentes de modificación superficial. Como anclas funcionales pueden utilizarse p.ej. el SiO₂, TiO₂, -COOH, HfO₂, -Au, -Ag, N-hidroxisuccinimida, -NH₂, epóxidos, maleinimida, hidrazidas de ácidos, hidrazida, azida, diazirina, benzofenona, entre otros, para las condensaciones con diferentes reactivos.

Otro método de inmovilización de oligonucleótidos sobre las superficies es el llamado fotoengarce (photolinking). Para ello, el oligonucleótido con grupos NH₂ (aptámero) se dota en primer lugar de una molécula llamada de fotoengarce (p.ej. antraquinona), que después de activarse con radiación UV puede participar en reacciones fotoquímicas con la superficie del plástico y por tanto el oligonucleótido se une a la superficie mediante enlace covalente. Para realizar este procedimiento, p.ej. la empresa Exiqon (Vedbaek, Dinamarca) suministra kits y sustancias que llevan los nombres comerciales de AQ-Link™ y DNA Immobilizer™.

Con sus propios ensayos, los inventores han podido demostrar que mediante determinados aptámeros escogidos, en especial mediante los que tienen una molécula de ácido nucleico de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO 1 a SEQ ID NO 17, se pueden fijar células precursoras endoteliales. De este modo, p.ej. sobre las superficies de "stents" recubiertas con aptámeros se pueden fijar células endoteliales, con lo cual dichos "stents" podrán adaptarse de manera óptima al tejido que reviste los vasos.

Con la fijación de las células y/o proteínas sobre la superficie recubierta con aptámeros se logra con ventaja una estructura superficial autóloga, con lo cual en el caso de los implantes se pueden evitar p.ej. los costes derivados de una "respuesta de hospedante contra injerto" y, por consiguiente, los costes posteriores a la implantación, que suelen ser frecuentes en este tipo de reacciones.

En otra forma de ejecución, el implante de la invención puede estar recubierto además con factores de crecimiento.

Esta forma de ejecución tiene la ventaja de que las células precursoras endoteliales (endothelial progenitor cells, EPC), se unen a la superficie a través de los aptámeros y gracias a los factores de crecimiento específicos, que actúan como inductores, se diferencian forman un endotelio de pleno valor. Estos factores de crecimiento pueden inmovilizarse también sobre la superficie del dispositivo p.ej. mediante aptámeros (co-inmovilización). Para ello es preferible elegir los factores de crecimiento entre el grupo formado por el "factor de crecimiento derivado de plaquetas" (PDGF), el "factor de crecimiento endotelial vascular" (VEGF), el "factor estimulador de la formación de colonias" (CSF), el "factor de crecimiento epidérmico" (EGF), el "factor de crecimiento nervioso" (NGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y/o los factores de crecimiento del supergrupo de los TGF. Los factores de crecimiento del supergrupo TGF (factores de crecimiento transformante) son p.ej. las BMP (proteínas morfogenéticas óseas), p.ej. la BMP-2 y la BMP-7.

De este modo, después de la implantación, las prótesis vasculares tratadas previamente de este modo pueden p.ej. fijar inmediatamente sobre la superficie las EPC de la sangre que circula a través de dichas prótesis y endotelializar el material de las prótesis en muy poco tiempo.

En una forma de ejecución es preferido además que los aptámeros tengan actividad de DNazima.

Esto tiene la ventaja de que se genera un recubrimiento por lo menos parcialmente enzimático. Si se emplean aptámeros específicos con actividad de DNazima, esto podrá provocar la degradación de aquellos mRNA que sean reconocidos por las DNazimas.

Esto puede ser ventajoso p.ej. para la regulación de la producción de la proteína Egr-1. La proteína Egr-1 es una proteína necesaria para el crecimiento de la musculatura lisa. Empleando las prótesis vasculares recubiertas de este tipo se impide p.ej. que se cierren los vasos. Con estos aptámeros enzimáticamente activos pueden regularse además p.ej. las cascadas de coagulación de la sangre.

En otra forma de ejecución es preferido que como superficie se emplee un material elegido entre el grupo formado por el politetrafluoretileno, poliestireno, poliuretano, poliéster, poli-lactida, ácido poliglicólico, polisulfona, polipropileno, polietileno, policarbonato, poli(cloruro de vinilo), poli(difluoruro de vinilo), poli(metacrilato de metilo), poli(tereftalato de etileno), ePTFT, Texin (poliéter-poliuretano) o copolímeros del mismo, poliamidas (Nylon), vidrio silanizado, cerámica o metal, en especial titanio, o mezclas de los mismos.

Como material pueden utilizarse también materiales nanométricos y/o materiales nanométricos formados por componentes de DNA y contienen un cierto porcentaje de aptámeros.

Estos materiales han dado buenos resultados en ámbitos técnicos, centrados p.ej. en la ingeniería de tejidos o en conjunto en la cirugía vascular y se emplean en diversas formas de ejecución.

La forma de la superficie puede elegirse según convenga.

Como implantes se toman en consideración en especial los corazones artificiales, las válvulas de corazón, las prótesis vasculares, los órganos artificiales, los "stents" (prótesis endovasculares), las caderas artificiales, los huesos, los tendones, los ligamentos, las articulaciones, los cartílagos, los implantes dentales, la córnea artificial, la piel, el

intestino, las lentes intraoculares, los órganos no celularizados, los implantados vasculares, etc. en los que todavía queda el armazón de soporte original, y muchos más. En tales superficies existe la necesidad de generar una adhesión celular específica.

5 Los implantes recubiertos de la invención se recubren ya sea "in vivo", a saber, con células, es decir, directamente en el paciente, en el que después se forma un tejido autólogo sobre el implante, ya sea "ex vivo" o "in vitro".

Los implantes recubiertos de la invención pueden utilizarse además como biorreactores para aislar determinados tipos de células y después para multiplicarlas con el fin de producir determinadas sustancias o bien como recambios de órganos (hígado, páncreas, etc.).

10 La invención se refiere además a moléculas de ácido nucleico que tienen una secuencia de nucleótidos de la 1 a la 17 del listado de secuencias adjunto.

Los inventores han detectado que con las moléculas de ácido nucleico es posible inmovilizar de modo específico las células precursoras endoteliales.

15 Estas moléculas de ácido nucleico modificadas o aptámeros tienen un gran número de ventajas con respecto a los anticuerpos monoclonales empleados habitualmente para el diagnóstico. Gracias a la generación de estructuras secundarias en función de las secuencias, la gama de ligandos potenciales de unión es mucho mayor que la gama inmune dispone para la preparación de anticuerpos monoclonales.

Por otro lado, los aptámeros pueden prepararse de modo mucho más rápido y económico. En un período de tres a cuatro semanas se pueden estudiar millones de ligandos potenciales.

20 En el marco del procedimiento de diagnóstico son idóneos como materiales de diagnóstico en especial los compuestos fluorescentes, p.ej. el isotiocianato de fluoresceína (FITC), la biotina, la digoxigenina y sus derivados, los marcadores enzimáticos, los marcados infrarrojos y los compuestos quelantes.

La invención se refiere además al uso de las anteriores moléculas de ácido nucleico para el recubrimiento de las superficies de los implantes recién nombrados.

25 Los inventores han detectado que es posible el uso directo de las moléculas de ácido nucleico reivindicadas como "moléculas capturadoras", lo cual permite la inmovilización "in situ" de la estructura biológica diana dentro de tejidos y/o líquidos.

La invención se refiere además a un procedimiento para recubrir implantes que tienen por lo menos una superficie que está en contacto con tejidos y/o líquidos, que está recubierta por lo menos parcialmente con sustancias que proporcionan adhesión a las células precursoras endoteliales, dicho procedimiento consta de los pasos siguientes:

30 a) preparación de aptámeros, que proporcionan la adhesión a las células precursoras endoteliales,

b) fijación de los aptámeros del paso a) sobre la superficie de un dispositivo.

Es preferible que como aptámeros se empleen moléculas de ácido nucleico que contengan por lo menos una de las secuencias de nucleótidos de la SEQ ID NO 1 a la SEQ ID NO 17 del listado de secuencias adjunto.

Los implantes preparados con este procedimiento pueden utilizarse directamente como implantes.

35 Otras ventajas se derivan de las figuras y del ejemplo que sigue.

Los ejemplos de ejecución de la invención se representan en la figura y se ilustran con mayor detalle en la descripción que sigue. Se representa:

en la figura 1a+b la caracterización de las moléculas de ácido nucleico reivindicadas mediante citometría de flujo.

Ejemplo

40 Selección de aptámeros contra las EPC (células precursoras endoteliales)

Se cultivan las EPC procedentes de médula ósea de ratas de Lewis en medios de selección y propagación comerciales.

Entre una biblioteca de oligonucleótidos de DNA (oligonucleótidos sintéticos, empresa MWG Biotech, Alemania), de los que se sabe que se fijan sobre factores de regulación (transcripción) intercelular, se seleccionan los oligonucleótidos (aptámeros) que se fijan sobre las EPC. Empleando las EPC se aplica el mismo procedimiento que se ha descrito anteriormente en el documento DE 100 19 154 y en la publicación "Systematic evolution of a DNA aptamer binding to rat brain tumor microvessels: selective targeting of endothelial regulatory protein pigpen" (Blank y col., J. Biol. Chem. 276(19), 16464-8, 2001).

En la siguiente tabla 1 se recogen las secuencias y denominaciones de los oligonucleótidos identificados, que se unen a las EPC:

FACS nº	oligonucleótidos	secuencias	resultado
control 1	células		neg.
control 2	SEL III 11-1	ctg ttg gac att caa aag ac	neg.
a)	4 cpg FITC	tcg tcg ttt tgt cgt ttt gtc gt	pos.
c)	Trirep 3	ccg ccg ccg ccg ccg ccg ccg	pos.
d)	Trirep 5	gcg gcg gcg gcg gcg gcg gcg	pos.
e)	Trirep 6	cgg ccg ccg ccg ccg ccg ccg	pos.
f)	Trirep 8	ttc ttc ttc ttc ttc ttc ttc	pos.
g)	Trirep 10	tta ggt tag gtt agg tta ggt tag g	pos.
h)	Cpgoligo 1	gct aga cgt tag cgt	pos.
i)	Cpgoligo 1 control	gct aga gct tag gct	pos.
j)	Cpgoligo 2	gat tgc ctg acg tca gag ag	pos.
k)	Cpgoligo 3	ttc atg acg ttc ctg atc gt	pos.
l)	Cpgoligo 3 control 1	tcc atg act ttc ctc agg tt	pos.
m)	Cpgoligo 3 control 2	tcc atg agc ttc ctg atg ct	pos.
n)	Cpgoligo 4 control	tgc tgc ttt tgt gct ttt gtg ctt	pos.
o)	dnazegr 1	ccg ccg cca ggc tag cta caa cga cct gga cga t	pos.
p)	aptzymegr 1	att gtg gtt ggt agt ata cat ttt tcc gcg gcc agg cta gct aca acg acc tgg acg at	pos.
q)	Soxs-2-78-113	ctt taa tgc ggg gta att tct tttt cca taa tcg c	pos.
r)	Cysk-2-66-106	tta ttt ccc tte tgt ata tag ata tgc taa atc ctt act t	pos.

10 Los oligonucleótidos se marcan con FITC (isotiocianato de fluoresceína) y se detecta su unión a las EPC mediante citometría de flujo (FACS). Los resultados de estos análisis se representan en las figuras 1a y 1b y se recogen en la tabla 1. En la tabla 1, "pos." significa la unión de las células (EPC) a los aptámeros marcados con FITC. Como control se emplea el oligonucleótido SEL III 11-1, que como se sabido no se une a las EPC. Los oligonucleótidos de a) a r) de la tabla 1 se someten al ensayo de citometría, los resultados de estos análisis se representan en las manchas de a) a 4) de la figura 1a) y 1b), que corresponden en cada caso a los oligonucleótidos de a) a r) empleados.

Tal como se desprende de las manchas de a) a r) de las figuras 1a y 1b, los oligonucleótidos identificados dan lugar en todos los casos a reacciones positivas de unión. Los oligonucleótidos o) y p) se identifican como DNazimas.

Las secuencias de 1 a 17 recogidas en el listado de secuencias corresponden a los oligonucleótidos de a) a 4) recogidos en la tabla 1.

20 Para la medición de los procesos de inmovilización se emplea una cámara de flujo, que se halla debajo de un microscopio de fluorescencia. En la cámara de flujo se halla el material soporte recubierto con aptámeros (engarce: fotoengarce, AQ Photochemistry, Exiqon, Dinamarca). A través de la cámara pasan suspensiones celulares, soluciones de proteínas, plasma, sangre y otras soluciones biológicamente relevantes. La diana se marca con un reactivo fluorescente (proteína, célula u otros). La velocidad de deposición de las dianas ("captura") puede registrarse p.ej. con una videocámara.

En lugar de una cámara de flujo puede utilizarse también una placa ELISA convencional, recubierta con el aptámero. A través de los anticuerpos marcados puede cuantificarse la diana por técnicas ELISA estándar.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Universidad Eberhard-Karl de Tubinga (Alemania)
 <120> Dispositivos recubiertos con sustancias que proporcionan adhesión al material biológico
- 5 <130> 5402P222W0
 <160> 17
 <170> PatentIn versión 3.1
 <210> 1
 <211> 23
- 10 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de nucleótido
 <400> 1
- 15 tcgctgtttt gtcgtttgt cgt 23
 <210> 2
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
- 20 <220>
 <223> Secuencia de nucleótido
 <400> 2
 ccgccgccgc cgcgccgcc g 21
 <210> 3
- 25 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de nucleótido
 <400> 3
- 30 gcggcggcgg cggcggcggc g 21
 <210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
- 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de nucleótido
 <400> 4
 cggcgggegge ggcggcggcg g 21
- 40 <210> 5
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
- 45 <223> Secuencia de nucleótido
 <400> 5
 ttcttcttct tcttcttct c 21
 <210> 6
 <211> 25
- 50 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de nucleótido
 <400> 6
- 55 ttaggttagg ttaggttagg ttagg 25
 <210> 7
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
- 60 <220>
 <223> Secuencia de nucleótido
 <400> 7
 gctagacgtt agcgt 15
 <210> 8

<211> 15
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Secuencia de nucleótido
 <400> 8
 gctagagctt aggct 15
 <210> 9
 <211> 20
 10 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de nucleótido
 <400> 9
 15 gattgcctga cgtcagagag 20
 <210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Secuencia de nucleótido
 <400> 10
 ttcattgacgt tctgatcgt 20
 <210> 11
 25 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de nucleótido
 30 <400> 11
 tccatgactt tctcaggtt 20
 <210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de nucleótido
 <400> 12
 tccatgagct tctgatgct 20
 40 <210> 13
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Künstlich secuencia
 <220>
 45 <223> Secuencia de nucleótido
 <400> 13
 tgctgctttt gtgctttgt gctt 24
 <210> 14
 <211> 34
 50 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de nucleótido
 <400> 14
 55 ccgcgccag gctagctaca acgacctgga cgat 34
 <210> 15
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Secuencia de nucleótido
 <400> 15
 attgtggttg gtagtataca ttttccgcg gccaggctag ctacaacgac ctggacgat 59
 <210> 16
 65 <211> 34

<212> DNA
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia de nucleótido
5 <400> 16
ctttaatgcg gggaatttc tttccataa tcgc 34
<210> 17
<211> 40
<212> DNA
10 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia de nucleótido
<400> 17
ttattccct tctgtatata gatatgctaa atccttactt 40

15

REIVINDICACIONES

1. Implante que tiene por lo menos una superficie que está en contacto con tejidos y/o líquidos del cuerpo humano o animal, que está recubierta por lo menos parcialmente con sustancias que proporcionan adhesión a las células precursoras endoteliales (EPC), caracterizado porque las sustancias son aptámeros.
- 5 2. Implante según la reivindicación 1, caracterizado porque los aptámeros son moléculas de ácido nucleico, que contienen por lo menos una de las secuencias de SEQ ID NO 1 a SEQ ID NO 17 del listado de secuencias adjunto.
3. Implante según la reivindicación 1, caracterizado porque los aptámeros son moléculas de ácido nucleico que tienen por lo menos una de las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO 1 a SEQ ID NO 17 del listado de secuencias adjunto.
- 10 4. Implante según una de las reivindicaciones de 1 a 3, caracterizado porque los aptámeros se integran en la superficie directamente y/o a través de una molécula de engarce.
5. Implante según una de las reivindicaciones de 1 a 4, caracterizado porque contiene además factores de crecimiento.
- 15 6. Implante según la reivindicación 5, caracterizado porque los factores de crecimiento se eligen entre el grupo formado por el "factor de crecimiento derivado de plaquetas" (PDGF), el "factor de crecimiento endotelial vascular" (VEGF), el "factor estimulador de la formación de colonias" (CSF), el "factor de crecimiento epidérmico" (EGF), el "factor de crecimiento nervioso" (NGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y/o los factores de crecimiento del supergrupo de los "factores de crecimiento transformante" (TGF).
- 20 7. Implante según una de las reivindicaciones de 1 a 6, caracterizado porque los aptámeros tienen actividad de DNAsima.
8. Implante según una de las reivindicaciones de 1 a 7, caracterizado porque la superficie tiene un material, que se elige entre el grupo formado por el politetrafluoretileno, poliestireno, poliuretano, poliéster, poli-lactida, ácido poliglicólico, polisulfona, polipropileno, polietileno, policarbonato, poli(cloruro de vinilo), poli(difluoruro de vinilo), poli(metacrilato de metilo), poli(tereftalato de etileno), ePTFT, Texin (poliéter-poliuretano) o copolímeros del mismo, poliamidas (Nylon), vidrio silanizado, cerámica o metal, en especial titanio, o mezclas de los mismos.
- 25 9. Uso de una molécula de ácido nucleico, que tiene una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 1 a la SEQ ID NO 17 del listado de secuencias adjunto, para recubrir superficies de un implante según una de las reivindicaciones de 1 a 11, para proporcionar adhesión a las células precursoras endoteliales (EPC).
- 30 10. Procedimiento de preparación de un implante que tiene por lo menos una superficie que está en contacto con tejidos y/o líquidos del cuerpo humano o animal, que está recubierta por lo menos parcialmente con sustancias, que proporcionan adhesión a células precursoras endoteliales (EPC), dicho procedimiento consta de los pasos siguientes:
- a) preparación de aptámeros, que proporcionan la adhesión a las células precursoras endoteliales (EPC),
- b) fijación de los aptámeros del paso a) sobre la superficie de un dispositivo.
- 35 11. Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado porque como aptámeros se emplean moléculas de ácido nucleico, que contienen por lo menos una de las secuencias de nucleótidos de la SEQ ID NO 1 a la SEQ ID NO 17 del listado de secuencias adjunto.
- 40 12. Procedimiento según la reivindicación 11, caracterizado porque como aptámeros se emplean moléculas de ácido nucleico, que tienen por lo menos una de las secuencias de nucleótidos de la SEQ ID NO 1 a la SEQ ID NO 17 del listado de secuencias adjunto.

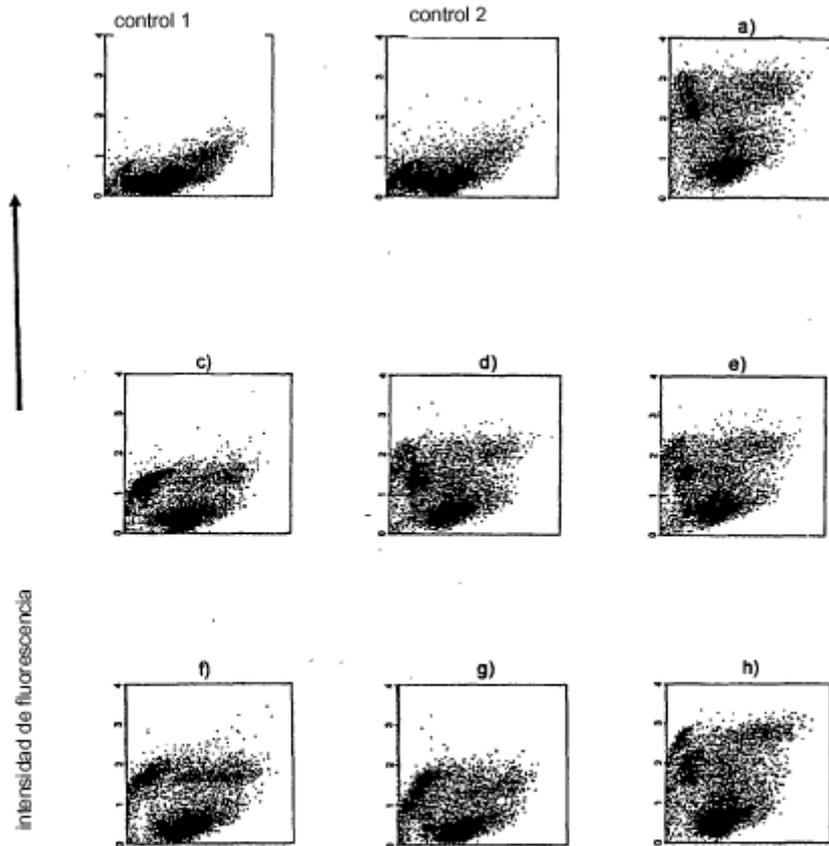


Fig. 1a

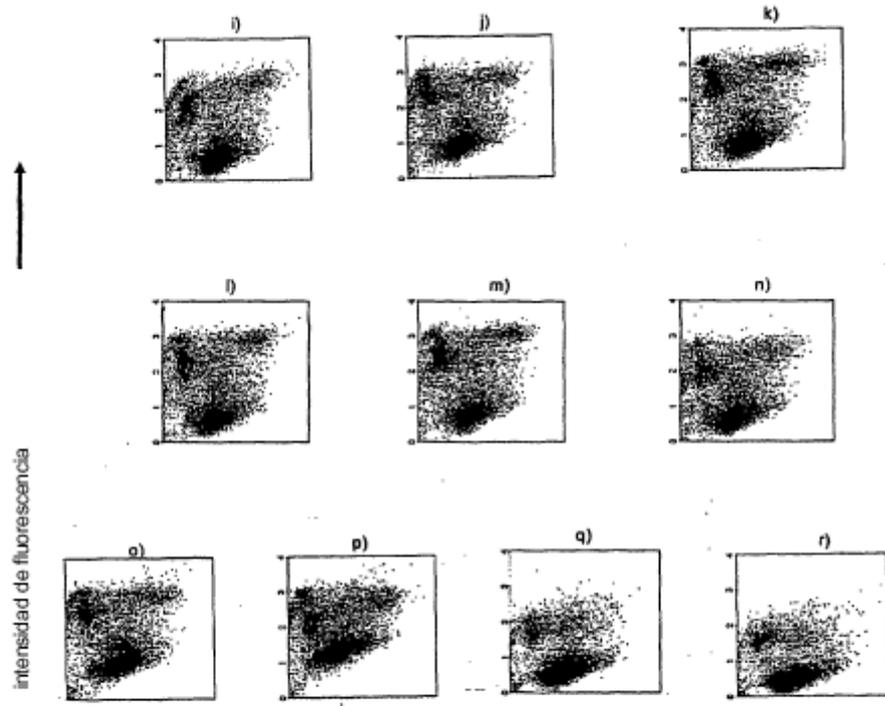


Fig. 1b