

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 785**

51 Int. Cl.:

A61L 27/36 (2006.01)

A61L 27/38 (2006.01)

A61L 27/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **10165816 .9**

96 Fecha de presentación: **08.11.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **2255834**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.12.2010**

54 Título: **Armazones por ingeniería con factores de anidamiento**

30 Prioridad:
08.11.2004 GB 0424560
11.03.2005 US 660766 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
31.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
31.07.2012

73 Titular/es:
K.U. Leuven Research and Development
Groot Begijnhof 58
3000 Leuven, BE y
AlphaGen N.V.

72 Inventor/es:
Flameng, Willem y
De Visscher, Geoffrey

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 385 785 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

Armazones por ingeniería con factores de anidamiento

Campo de la Invención

5 La presente invención se refiere al diseño de tejidos y a la siembra con células de armazones de dispositivos implantables. La invención se refiere adicionalmente a moléculas que aseguran la siembra *in vitro* y/o *in vivo* de matrices con células.

Antecedentes

10 Las válvulas cardíacas prostéticas adolecen de posibles complicaciones tales como trombosis, endocarditis, fallo mecánico, degradación tisular, calcificación. Estos problemas y el hecho de que estas prótesis carezcan de crecimiento y de potencial de remodelación en pacientes pediátricos son el motivo del diseño tisular de válvulas cardíacas.

El objetivo principal del diseño de tejidos es la restauración de la función mediante la liberación de elementos vivos que se incorporan al paciente. El diseño de tejidos se basa esencialmente en 3 elementos:

- células, que representan el componente vivo
- 15 - matriz, que proporciona una estructura de soporte tridimensional
- moléculas señal que influyen en la expresión de genes y en el depósito de la matriz extracelular.

El diseño de tejidos combina células y armazón para construir un nuevo tejido. Para la siembra celular de las matrices, se están investigando actualmente dos opciones: células autólogas cultivadas para la siembra *in vitro* y atracción de células autólogas *in vivo*.

20 Se están tomando en consideración diferentes matrices para el diseño de tejidos (véase la Figura 1). Una matriz puede ser un armazón moldeado de un polímero sintético o de colágeno o fibrina. El armazón puede ser natural (p. ej. una raíz acelular) o puede ser una prótesis entrecruzada.

25 Además, se han ideado diferentes procedimientos con el fin de obtener válvulas cardíacas viables diseñadas con tejidos. El paradigma completo describe la construcción de una válvula combinando las células y el armazón *in vitro*, seguido de una maduración *in vitro* del constructo en un biorreactor (Figura 2). El constructo maduro puede ser implantado después en el paciente y posiblemente experimentar una remodelación *in vivo* (revisado por Rabkin y Schoen (2002) Cardiovasc. Pathol. 11, 305-317). El constructo más meticulosamente estudiado es una válvula creada por Hoerstup et al. ((2002) Circulation 106, 1143-1150)). Ellos lograron obtener una válvula pulmonar de oveja viable y remodelada utilizando el paradigma completo con un biorreactor.

30 Campbell et al. ((1999) Circ. Res. 85, 1173-1178) han propuesto asegurar la siembra de armazones en el diseño de tejidos de vasos sanguíneos haciendo uso de un mecanismo de defensa conocido, esto es la reacción a un cuerpo extraño. Una reacción a cuerpo extraño madura incluye una capa de macrófagos, varias capas de fibroblastos y una capa mesotelial externa (Butler et al. (2001a) Biomed. Sci. Instrum. 37, 19-24; Butler et al. (2001b) J. Invest Surg. 14, 139-152). Aunque Campbell et al. (1999, citado más arriba) declaran que el fibroblasto deriva de macrófagos trans-
35 diferenciados, no se ha publicado todavía ninguna evidencia concluyente.

Para que sean satisfactorios, estos métodos tienen que cumplir numerosos retos reguladores, incluyendo una función y una durabilidad óptimas. Para justificar el elevado coste de las válvulas sometidas a ingeniería tisular, se debe demostrar que tienen calidades superiores a las válvulas existentes. Adicionalmente todas las técnicas anteriormente mencionadas tienen que superar el resto de la bio-seguridad. Las cuestiones y las pautas de bio-
40 seguridad en lo que respecta a la FDA están bien documentadas ("*Guidance on applications for products comprised of living autologous cells manipulated ex vivo and intended for structural repair or reconstruction*". 95N-0200 (1996); "*Proposed approach to regulation of cellular and tissue-based products – The food and drug administration*". Journal of Hematotherapy 6: 195-212 (1997); "*Guidance for industry – Guidance for human somatic cell therapy and gene therapy*". Human Gene Therapy 9:1513-1524 (1998); "*PHS guideline on infectious disease issues in xenotransplantation*". (2001); "*Transmissible spongiform encephalopathies advisory committee meeting*". (2001)). "*Transmissible spongiform encephalopathies advisory committee meeting*". (2001)).
45

El uso de células cultivadas o incluso recogidas *in vitro* plantea problemas específicos. Según se ilustra en la Figura 3, tanto la recogida como el cultivo de células pueden inducir inestabilidad genética o mutagénesis. Esto puede atribuirse a diferentes factores. Tanto la recogida como el cultivo requieren generalmente el uso de proteínas
50 extrañas. El origen xenogénico de las enzimas o los sueros proteolíticos es una fuente potencial de contaminación por patógenos entre especies. Tal contaminación, si no se detecta, no solo pone en riesgo el propio cultivo, sino

también al receptor. El mecanismo de proliferación de ciertos virus puede permitir la inserción de su genoma en el genoma del anfitrión, lo que puede provocar mutaciones perjudiciales dependiendo del sitio de inserción. Ciertos genes virales también pueden actuar como oncogenes. Las cuestiones de bioseguridad se aplican igualmente al uso de materiales xenogénicos. Además del riesgo de infecciones virales, el cultivo de células también expone a las células a condiciones no fisiológicas tales como una tensión de oxígeno incrementada. De media, el tejido de los mamíferos está expuesto a una tensión de oxígeno que varía de 2 a 8%, mientras que las incubadoras generalmente usan aire comprimido con una tensión de oxígeno de 21%. Se ha demostrado que los fibroblastos murinos primarios son extremadamente vulnerables al daño al DNA que da como resultado senescencia e inmortalización espontánea. A pesar del hecho de que en estos experimentos los fibroblastos humanos estaban mucho menos afectados, otros estudios demuestran que las células humanas no son insensibles al estrés oxidativo. Por ejemplo, se ha demostrado que los condrocitos de cartílago articular humano son sensibles al estrés oxidativo. Usando líneas celulares, se ha demostrado que el oxígeno induce predominantemente reordenamientos del genoma en células que proliferan rápidamente. Por otra parte, se ha demostrado que los fibroblastos humanos también sufren senescencia en respuesta al estrés oxidativo, lo que puede provocar acortamiento del telómero y roturas de la hebra sencilla en el ADN telomérico a una velocidad que depende del estrés oxidativo. En cultivos de fibroblastos, se obtuvo un incremento en las duplicaciones de población cuando se disminuía la tensión de oxígeno. Otra observación notable es que la senescencia regula al alza ocho genes entre los que se encuentran fibronectina, osteonectina y procolágeno alfa1.

La bioseguridad es un aspecto muy importante de los retos reguladores para válvulas cardíacas sembradas con células *in vitro* e impone el desarrollo de un control de calidad restrictivo para cada prótesis valvular individual antes de la implantación en el receptor. Los retos reguladores incrementados también incrementarán notablemente los costes de tales prótesis, limitando de ese modo su uso a grupos específicos de pacientes.

Existe la necesidad en la técnica de un modo de obtención de válvulas cardíacas y otros dispositivos implantables viables sometidos a ingeniería tisular. Más particularmente, existe una necesidad de armazones que sean adecuados para la siembra celular, particularmente la siembra celular *in vivo*, muy particularmente cuando se necesita que la siembra celular se produzca bajo condiciones de estrés por cizalladura incrementado, tales como armazones de válvulas cardíacas y vasos sanguíneos.

Compendio de la invención

La presente invención se refiere generalmente al uso de factores de anidamiento en la generación de armazones de tejidos y órganos usados para su implantación en el cuerpo de un animal o un ser humano. De acuerdo con un aspecto concreto, la presente invención se refiere al uso de factores de anidamiento en la generación de armazones susceptibles de alto estrés por cizalladura al implantarse en el organismo. Muy particularmente, la invención se refiere a armazones para su uso en el sistema cardiovascular, el sistema linfático u otros vasos tales como la uretra. Una realización específica de la presente invención se refiere a armazones que comprenden una matriz estructural revestida con uno o más factores de anidamiento. Más particularmente, los factores de anidamiento de la presente invención son factores capaces de unirse a células pluripotenciales o células progenitoras.

Un aspecto particular de la presente invención hace referencia a armazones de dispositivos implantables destinados a un uso y una función prolongados dentro del organismo, es decir, basados en una matriz duradera biocompatible pero no biodegradable. De acuerdo con una realización específica, la matriz estructural es una prótesis no entrecruzada o una raíz aórtica acelularizada.

Un aspecto concreto adicional de la presente invención se refiere a armazones que comprenden uno o más factores de anidamiento en los que el factor de anidamiento es un ligando de receptor, o uno de sus fragmentos que comprende el dominio de unión al receptor, o un péptido que se une al receptor. Muy particularmente, el receptor es un receptor expresado sobre células pluripotenciales o células progenitoras.

Las realizaciones concretas de los factores de anidamiento o proteínas de anidamiento usados en el contexto de la presente invención son factor derivado del estroma 1, factor de células pluripotenciales, VCAM-1, región P1 de fibrinógeno y región P2 de fibrinógeno, más concretamente factor derivado del estroma 1 (SDF-1) o factor de células pluripotenciales (SCF) o sus fragmentos o derivados.

En una realización particular, la matriz del armazón está revestida con uno o más factores de anidamiento y una proteína que facilita la interacción entre una célula y la matriz del andamiaje. Tal proteína puede ser, pero no se limita a, fibronectina, colágeno o fibrinógeno. En una realización particular en la que la proteína de anidamiento es VCAM-1, la interacción entre VCAM-1 y su receptor en una célula se potencia adicionalmente de forma opcional mediante la adición del inhibidor de proteasa pleiotrópico macroglobulina alfa2.

En una realización particular de la invención, el factor o los factores de anidamiento se entrecruzan químicamente a la matriz estructural por medio de un brazo conector. En la presente memoria, un brazo conector está espaciado

entre el factor de anidamiento y la matriz estructural. La unión entre el factor de anidamiento y la matriz puede ser irreversible (permanente) o biodegradable.

5 De acuerdo con una realización adicional de la presente invención, el factor o los factores de anidamiento de la presente invención pueden estar en la forma de una proteína de fusión con una proteína que facilita la unión a la matriz estructural (es decir, las dos proteínas forman una cadena polipeptídica consecutiva).

En una realización concreta, la matriz estructural del armazón de la presente invención es un material biológico tal como pericardio bovino entrecruzado o raíces aórticas porcinas.

En una realización adicional más, el factor de anidamiento está químicamente entrecruzado con la matriz del armazón de la presente invención.

10 La presente invención también se refiere a métodos para preparar el armazón de la presente invención por medio de los cuales la matriz del armazón se reviste con uno o más factores de anidamiento. De acuerdo con una realización concreta, el revestimiento se asegura mediante impregnación, es decir mediante incubación de la matriz en una disolución que comprende uno o más de los factores de anidamiento mencionados anteriormente en un tampón de impregnación apropiado (por ejemplo: solución salina tamponada con fosfato). Las realizaciones particulares de este
15 método incluyen una etapa de prerrevestimiento con una o más proteínas que facilitan la interacción entre el factor de anidamiento y la matriz estructural.

20 De acuerdo con una realización concreta, los armazones de la presente invención no comprenden factores quimioatrayentes o factores de movilización. Alternativamente, los armazones de la presente invención comprenden uno o más factores de anidamiento de la presente invención en combinación con uno o más factores quimioatrayentes y/o factores de movilización.

De acuerdo con esto, la presente invención proporciona kits que comprenden una matriz estructural, opcionalmente en la forma de un dispositivo implantable, tal como, pero no limitado a, un vaso sanguíneo o una válvula cardíaca, y uno o más factores de anidamiento.

25 Por consiguiente la invención se refiere al uso de factores de anidamiento para potenciar la siembra *in vivo* sobre un armazón adecuado para reemplazar un tejido u órgano alterado o enfermo. El uso de factores de anidamiento tiene ventajas concretas en la generación de armazones para la implantación en una zona que está bajo alto estrés por cizalla, p. ej. un armazón para su uso en el sistema cardiovascular tal como una válvula cardíaca o un injerto vascular.

Descripción detallada de la invención

30 La presente invención describe armazones, más particularmente armazones para dispositivos implantables que comprenden una matriz que, por la presencia de uno o más factores de anidamiento, asegurará la unión de células apropiadas a los mismos. Un "armazón", según se utiliza en la presente memoria, se refiere a un dispositivo médico implantable para reparación, restauración, aumento o regeneración tisular o para reemplazar un tejido u órgano enfermo, dañado, perdido o comprometido de otro modo en el organismo de un paciente. Un "dispositivo médico
35 implantable", según se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquier dispositivo que esté destinado a ser introducido y opcionalmente implantado en el organismo humano, incluyendo dispositivos usados para la implantación en vasos, conductos u órganos corporales, tales como un separador intraluminal ("stent"), un catéter, una cánula, una vaina de injerto vascular o arterial, un dispositivo para implantación en el esófago, la tráquea, el colon, el tracto biliar, el tracto urinario, dispositivos ortopédicos, etc.

40 De particular interés dentro del contexto de la presente invención son los armazones que están destinados a zonas en las que el estrés por cizalladura actuará contra la adherencia natural de células apropiadas a una matriz. Así, de particular interés en el contexto de la presente invención son los armazones para su uso en la sustitución y/o la restauración de tejidos que son susceptibles de alto estrés por cizalladura, tales como un vaso sanguíneo o una válvula cardíaca, el uréter, los conductos biliares, los conductos pancreáticos, los conductos císticos, hepáticos o
45 biliares comunes, y similares.

La siembra de tales armazones puede asegurarse *in vivo*, *in situ* (es decir, durante la implantación en la zona de la arteria enferma o dañada) *in vivo*, *ex situ* (es decir, la implantación en otro sitio del cuerpo) o *in vitro* (p. ej. en un biorreactor).

50 Las proteínas de anidamiento o los factores de anidamiento se definen como moléculas de atraque que interactúan con uno o más tipos de células específicos y, de este modo, cuando se anclan a una matriz, permiten el enriquecimiento de esos tipos de células sobre la matriz. Tal molécula de atraque asegura la interacción entre la matriz y una molécula en la superficie de la célula, tal como otra proteína o una estructura de carbohidrato, también referida en la presente memoria como molécula diana celular. De acuerdo con una realización particular de la

- 5 invención, el factor de anidamiento es una molécula que asegura una interacción específica entre la matriz y uno o más tipos de células específicos; esto puede asegurarse mediante la unión del factor de anidamiento a una molécula que se produce esencialmente solo sobre la superficie de uno o más tipos de células específicos o al ajustar el factor de anidamiento a fin de que se una solamente a la molécula diana celular sobre uno o más tipos de células específicos.
- 15 Por lo general, la interacción entre el factor de anidamiento y la célula es una interacción ligando-receptor. Así, una realización concreta de la invención se refiere a armazones que comprenden uno o más ligandos de receptores que se unen a un cierto tipo de célula, más particularmente a los tipos de célula descritos más abajo en la presente memoria.
- 20 De acuerdo con otra realización, los factores de anidamiento son moléculas que se unen específicamente a estructuras de carbohidrato que se expresan, muy concretamente de manera específica sobre células pluripotenciales o células progenitoras. Las porciones de estas proteínas que se unen a carbohidratos que conservan sus propiedades de unión a azúcares son igualmente adecuadas para funciones como factor de anidamiento.
- 25 Un factor de anidamiento adecuado para los armazones y los métodos de la presente invención puede ser una proteína truncada y/o un derivado tal como una proteína mutada, con tal de que conserve su capacidad para unirse a la molécula diana celular. Las regiones de unión mínimas de una proteína de anidamiento pueden definirse cartografiando las delecciones del truncamiento. De acuerdo con una realización concreta de la presente invención, la molécula diana celular es un receptor y el factor de anidamiento es un fragmento de uno de sus ligandos, tal como uno de sus fragmentos que se unen al receptor. Por lo general, los factores de anidamiento que son formas derivadas o mutadas de ligandos proteínicos o sus fragmentos tienen una identidad de la secuencia de aminoácidos de al menos 80%, particularmente al menos 90%, muy particularmente al menos 95% con el ligando natural o su fragmento mientras que conservan la capacidad para unirse a la molécula diana celular.
- 30 Los factores de anidamiento de la presente invención aseguran y/o incrementan la adherencia de las células a una matriz bajo condiciones variables. La unión de células a través de los factores de anidamiento de la presente invención proporciona ventajas particulares para la siembra de armazones de tejidos en condiciones de alto estrés por cizalladura.
- 35 Las células que son capturadas por medio de los factores de anidamiento de la presente invención son células que tienen interés en la generación de un almacén apropiado, es decir un almacén que puede funcionar de modo similar al tejido u órgano al que sustituye. De acuerdo con una realización concreta de la presente invención, el factor de anidamiento es una proteína capaz de unirse a una célula pluripotencial o una célula progenitora (es decir, no diferenciada pero asignada a uno o más linajes celulares), más concretamente células progenitoras hematopoyéticas.
- 40 De acuerdo con una realización concreta de la presente invención, el factor de anidamiento es una molécula capaz de unirse a una célula pluripotencial mesenquimática o hematopoyética. La presente invención demuestra que el anidamiento de las células pluripotenciales y/o células progenitoras sobre una matriz asegurará un almacén matricial sembrado con células que se diferencian, entre otras, en células miofibroblásticas.
- 45 Las moléculas de anidamiento particularmente adecuadas son del grupo que consiste en los epítomos P1 y P2 de fibrinógeno, el factor de células pluripotenciales (SCF), el factor derivado del estroma 1 (SDF-1), la fibronectina (FN) y la molécula de adherencia celular vascular 1 (VCAM-1) (figura 4), muy particularmente SDF-1 o SCF o sus fragmentos o derivados que conservan su afinidad de unión al receptor.
- 50 Una realización particular de la presente invención se refiere al uso de SDF-1 como una proteína de anidamiento para la siembra de una matriz. El SDF-1 (factor derivado de células del estroma 1) también se conoce como Pre-Factor Estimulante del crecimiento de células B (PBSF) o como quimioquina, motivo cxc, ligando 12 (CXCL12). Las secuencias de ADNc y de proteína del SDF-1 se presentan respectivamente en Genbank bajo los Números de Registro E09668 y NP_001029058. El SDF-1 existe en dos formas diferentes de 68 aminoácidos (alfa) y 72 aminoácidos (beta), respectivamente, donde la forma beta tiene 4 aminoácidos adicionales en el extremo carboxi en comparación con la forma alfa. El SDF-1 es el ligando del receptor CXCR4 (Bleuel et al. (1996) Nature 382, 829-833). La importancia de un extremo N intacto de SDF1 para la unión al receptor está documentada [p. ej. Sadir J Biol Chem. 2004 279, 43854-43860]. Así, para la presente invención, los fragmentos de SDF-1 son fragmentos que conservan el extremo amino de la proteína. De acuerdo con una realización particular, un fragmento o derivado de SDF-1 es uno que contiene la región amino terminal (aminoácidos 1-14) y la lámina beta central (aminoácidos 15-54) pero que carece de uno o más aminoácidos de la región carboxi terminal (aminoácidos 55-68 y 55-72 de la forma alfa y beta, respectivamente). La actividad de unión al receptor de tales fragmentos puede evaluarse según se describe en Sadir et al. (citado anteriormente).
- 55

De acuerdo con otra realización más de la presente invención, se usa el SCF como una proteína de anidamiento en una matriz. El SCF es reconocido por células pluripotenciales mesenquimáticas (MSC) de la médula ósea a través de su receptor de proteína tirosina quinasa (c-kit) en ratón o CD117 en seres humanos (Jiang et al. (2002) Nature 418, 41-49; Nakamura et al. (2004) Exp. Hematol. 32, 390-396) y puede de este modo asegurar el anidamiento de MSC. Adicionalmente, el CD117 es un factor esencial en el desarrollo de células progenitoras hematopoyéticas (Agis et al. (1993) J Immunol, 151, 4221-4227). El SCF (Factor de Células Pluripotenciales) también es conocido como ligando KIT (KITLG), factor de crecimiento de células cebadas (MGF) y homólogo del Factor Steel (SF). Las secuencias de ADNc y proteína del SCF están depositadas en Genbank bajo el Número de Registro M59964. El SCF es el ligando para el receptor de tirosina quinasa KIT. El SCF existe naturalmente como isoformas ancladas a la membrana o solubles como resultado de la reparación del ARN y el procesamiento proteolítico alternativos. De acuerdo con una realización particular de la invención, un fragmento o derivado de SCF comprende el fragmento amino terminal de 189 aminoácidos que contiene el dominio extracelular de SCF. Alternativamente, un fragmento o derivado de SCF comprende la forma soluble de origen natural que contiene los 165 aminoácidos amino terminales de SCF. De acuerdo con otra realización particular más, el fragmento o derivado de SCF comprende los 141 residuos amino terminales que contienen el núcleo de unión al receptor de SCF. La numeración de estos fragmentos se refiere a una secuencia proteínica de 248 aminoácidos que se libera después de la escisión de la secuencia líder. Los fragmentos de SCF mencionados anteriormente y su capacidad de unión al receptor son descritos por Langley et al. (1994) Arch Biochem Biophys. 311, 55-61. El SCF o los fragmentos o derivados de SCF de la presente invención pueden ser monoméricos o diméricos. Los fragmentos diméricos pueden obtenerse al oxidar o entrecruzar residuos de cisteína que están implicados en la unión de dímeros. Alternativamente, el SCF o sus fragmentos se expresan recombinantemente en tándem con un péptido espaciador entre ellos.

Una realización particular adicional de la presente invención se refiere al uso de VCAM-1 como proteína de anidamiento. Las secuencias de ADNc y proteína de VCAM-1 se depositan en Genbank bajo el Número de Registro M60335.

Una realización particular adicional de la invención se refiere al uso combinado de un factor de anidamiento y una molécula que influye en la interacción entre la molécula de anidamiento y su molécula diana celular (también denominada en la presente memoria proteína facilitadora, véase más abajo). De acuerdo con una realización, VCAM-1 se añade a la matriz combinado con macroglobulina alfa2 (Figura 7), debido a que este inhibidor de proteasas pleiotrópicas puede estabilizar la unión entre VCAM-1 y VLA4. Esta función es un resultado de la inhibición de proteasa pleiotrópica que degrada la proteína de VCAM-1 (Levesque et al. (2001) Blood 98, 1289-1297). Las secuencias de ADNc y proteína de la macroglobulina alfa2 se depositan en Genbank bajo el Número de Registro NM_000014.

De acuerdo con otra realización concreta, los epítomos P1 y P2 del fibrinógeno se usan como proteínas de anidamiento. P1 y P2 se unen mediante la integrina mac1 de macrófagos (MF). Se demostró que la reacción a los cuerpos extraños es iniciada por la adsorción de fibrinógeno a la superficie extraña. Esto induce cambios de conformación de la molécula que dan como resultado la exposición de 2 epítomos P1 y P2 (Hu et al. (2001) Blood 98, 1231-1238). Los macrófagos unidos atraerán a continuación a las células pluripotenciales como lo hacen en una reacción a cuerpos extraños "convencional". Una realización de la presente invención es una matriz adecuada que comprende los epítomos P1 y P2 para atraer células pluripotenciales endógenas y adecuada para la sustitución directa de una válvula cardíaca deficiente, enferma o alterada. Los epítomos P1 y P2 pueden estar conectados a la matriz. La invención también implica el uso de los epítomos P1 y P2 para revestir un armazón con dichos epítomos P1 y P2 para atraer células pluripotenciales endógenas después de la implantación. Según describen Hu et al. (2001, citado anteriormente), el epítomo P1 se refiere a los aminoácidos 190 a 202 del fibrinógeno gamma, mientras que el epítomo P2 se refiere a los aminoácidos 377 a 395 del fibrinógeno gamma.

De acuerdo con otra realización más de la presente invención, la matriz comprende fibronectina para anidar células progenitoras que expresan VLA-4 o VLA-5. Las diferentes variantes de reparación de la fibronectina humana (FN1) se enumeran en la base de datos de nucleótidos de NIH bajo los Núm. de Registro: NM_212482 (variante 1), NM_212475 (variante 2), NM_002026 (variante 3), NM_212478 (variante 4), NM_212476 (variante 5), NM_212474 (variante 6) y NM_054034 (variante 7).

Particularmente adecuada para el uso en el armazón de la presente invención es una matriz o armazón que comprende fibronectina y/o VCAM-1 y que comprende además SDF-1 para actuar sinérgicamente con fibronectina y/o VCAM-1.

El uso de las proteínas de anidamiento factor derivado del estroma 1, factor de células pluripotenciales, VCAM-1, región P1 de fibrinógeno o región P2 de fibrinógeno, caracterizado anteriormente, y de cualesquiera de sus homólogos funcionales o derivados actualmente en la técnica o disponibles para el experto en la técnica, como agentes de anidamiento en armazones para válvulas cardíacas o vasos sanguíneos, es parte de esta invención.

5 En teoría, los factores de anidamiento de la presente invención pueden obtenerse del receptor del andamiaje, pero con propósitos prácticos será más probable que los factores de anidamiento se obtengan sintéticamente o recombinantemente (a partir de un organismo bien procariótico o bien eucariótico). Todas las proteínas de anidamiento mencionadas anteriormente están disponibles comercialmente. El SDF-1 humano recombinante y el SCF humano recombinante (*E. coli*) pueden obtenerse de diferentes compañías (Sigma RBI, R&D systems, Campro y Calbiochem). La VCAM-1 humana recombinante (línea celular de mieloma de ratón) está disponible de R&D systems. La fibronectina nativa derivada de fibroblastos humanos está disponible de Sigma RBI y Calbiochem. El fibrinógeno nativo derivado de plasma humano está disponible de Sigma RBI y Calbiochem.

10 En cuanto a los epítomos P1 y P2 del fibrinógeno, los epítomos pueden derivarse del fibrinógeno nativo mediante escisión proteolítica de la proteína nativa, pero más preferiblemente mediante biosíntesis *in vitro* siguiendo la secuencia proteínica descrita por Hu et al. (citado anteriormente).

15 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, la presencia de uno o más factores de anidamiento asegura la unión de uno o más tipos de células concretas a una matriz. De este modo, en el contexto de la ingeniería tisular, más particularmente la ingeniería tisular de órganos vasculares o linfáticos u otros vasos tales como la uretra, donde la matriz está constantemente en contacto con fluido, tal como la sangre o el fluido linfático, y las células del mismo, la presencia de agentes de anidamiento solos puede ser suficiente para asegurar la población de la matriz con las células apropiadas. La presente invención demuestra que pueden usarse factores de anidamiento para conectar físicamente y específicamente células apropiadas a una matriz de elección (Figura 5). Así, una realización concreta de la presente invención se refiere a armazones que comprenden factores de anidamiento. Muy particularmente, la presente invención se refiere a armazones que comprenden sobre su superficie solamente uno o más factores de anidamiento, y no otras proteínas implicadas en la quimioatracción, la movilización, etc. No solo los factores de anidamiento asegurarán suficientemente la unión de las células pertinentes a la matriz, sino que la ausencia de otras moléculas que afectan a la atracción y/o la movilización celular evita efectos secundarios negativos potencialmente importantes tales como la vascularización del injerto.

25 Sin embargo, también se prevé dentro de la presente invención que se use una combinación de factores de anidamiento y otras moléculas bioactivas para el revestimiento de la matriz que constituye el armazón de la presente invención.

30 De este modo, de acuerdo con una realización adicional de la invención, la matriz también comprende, además del uno o más factor o factores de anidamiento, uno o más de otros factores que facilitan la unión de células apropiadas a una matriz. Tales otros factores incluyen agentes de movilización, agentes quimioatrayentes y factores facilitadores.

35 "Agentes de movilización", en el contexto de la presente invención, son agentes que movilizan células, tales como células pluripotenciales, desde el lugar del cuerpo en el que se originan. Más concretamente, los agentes de movilización se usan para incrementar la cantidad de células pluripotenciales en la sangre. Un ejemplo concreto de un agente de movilización es el factor estimulador de colonias de granulocitos o G-CSF. Este factor de origen natural tiene baja toxicidad y efecto sinérgico cuando se combina con otros factores de crecimiento hematopoyéticos. Otros agentes de movilización son adenosina, factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF), factor de células pluripotenciales (SCF), interleuquina-1 (IL1), IL3, IL7, IL11 e IL12 (Fu y Liesveld (2000) Blood Rev. 14, 205-218.). El uso de factores de movilización además de los factores de anidamiento de acuerdo con la presente invención es de particular interés en aquellas herramientas y métodos que prevén la siembra de la matriz *in vivo*. El agente de movilización se incluye opcionalmente en la matriz, pero también puede administrarse al organismo antes de la implantación del armazón.

45 Adicionalmente o alternativamente, la presente invención prevé el uso de uno o más factores quimioatrayentes junto con el factor o los factores de anidamiento y opcionalmente el agente o los agentes de movilización descritos anteriormente. "Quimioatrayentes" o "compuestos quimiotácticos", según se usa en la presente memoria, son compuestos capaces de atraer células. En general, tienen un efecto sobre las células cuando están presentes en un gradiente. Posibles agentes quimioatrayentes para células pluripotenciales son el factor de crecimiento similar a insulina (IGF) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Young et al. (1999) Clin. Exp. Metastasis 17, 881-888).

50 Adicionalmente o alternativamente, la presente invención prevé el uso de uno o más agentes facilitadores junto con el factor o los factores de anidamiento y los factores adicionales opcionales descritos anteriormente. Los "factores facilitadores" son factores que facilitan o refuerzan la unión de células a las proteínas o los factores de anidamiento de la presente invención. Ejemplos de tales proteínas de facilitación incluyen el colágeno soluble, la albúmina, el fibrinógeno o la fibronectina. Las proteínas facilitadoras pueden aplicarse como revestimiento sobre la matriz junto con el factor de anidamiento o pueden aplicarse como revestimiento en forma de una capa separada.

55 De este modo, la presente invención se refiere a una matriz para el uso en la ingeniería tisular de vasos u otros armazones implantables, tales como un vaso sanguíneo o válvulas cardíacas, que comprende una matriz con uno o

más factores de anidamiento. Más concretamente, la invención se refiere a una matriz que comprende SDF-1 y/o SCF diseñada para sustituir válvulas cardíacas deficientes, enfermas o alteradas para la recelularización *in vivo*. La matriz o el armazón cargados con SDF-1 pueden comprender agentes de anidamiento adicionales y pueden comprender además uno o más agentes de movilización, por ejemplo un agente de movilización seleccionado del grupo que consiste en factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), adenosina, factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF), factor de células pluripotenciales (SCF), interleuquina-1 (IL1), IL3, IL7, IL11 e IL12 o una de sus combinaciones. La matriz puede comprender además uno o más agentes quimioatrayentes, por ejemplo un agente quimioatrayente seleccionado del grupo que consiste en factor de crecimiento similar a insulina (IGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento placentario (PLGF) o una de sus combinaciones.

De acuerdo con una realización, el paradigma de celularización de la presente invención comprende tres etapas (Figura 2): Opcionalmente, una etapa inicial de movilización de células pluripotenciales, en segundo lugar la implantación de un armazón (p. ej. un vaso o una válvula) revestido con factores de anidamiento y opcionalmente la liberación de agente quimioatrayente por el armazón. De acuerdo con una realización concreta, tal armazón es un vaso o una válvula para su uso en el sistema cardiovascular. Sin embargo, en esta realización, puesto que los injertos de válvula o vaso sanguíneo se implantan en la posición de la válvula o el vaso sanguíneo enfermos y están por consiguiente en contacto inmediato con la sangre, es suficiente implantar por lo tanto la matriz con los factores de anidamiento, opcionalmente combinados con agentes quimioatrayentes.

El constructo de válvula cardíaca preparado para el anclaje de células endógenas de acuerdo con la presente invención puede implantarse mediante un procedimiento de implantación convencional, tal como, pero no limitado a, el descrito posteriormente en la presente memoria. Las válvulas cardíacas se implantan en posición ortotópica o heterotópica con o sin la retirada completa o parcial de la válvula nativa. Se usan técnicas de implantación clásicas como las descritas en la presente memoria o la implantación puede implicar sistemas invasivos mínimos, endovasculares o percutáneos (véase más abajo). De forma similar, los métodos de implantación para injertos vasculares son conocidos en la técnica.

La tecnología de la invención también puede aplicarse a prótesis valvulares percutáneamente implantables mediante un método descrito en documentos tales como, pero no limitados a, EP 1152780A1 y WO 0045874A1. Estas solicitudes de patente describen un dispositivo para la implantación de una válvula cardíaca a través de una ruta percutánea comprendida por un globo de expansión periférica y una bomba de flujo sanguíneo axial central, y son particularmente adecuadas para injertos que no requieren siembra o maduración *in vitro*.

La presente invención se refiere por consiguiente a una matriz para el uso en la ingeniería de armazones de órganos o tejidos, más concretamente armazones de órganos y/o tejidos que están sometidos a estrés por cizalladura, tales como armazones del sistema cardiovascular o linfático o armazones del tracto urinario. Muy particularmente, la presente invención se refiere armazones de tejido de válvulas cardíacas y vasos sanguíneos. De acuerdo con una realización particular de la presente invención, el armazón que comprende la matriz con el factor o los factores de anidamiento de acuerdo con la presente invención se modela hasta la conformación del dispositivo implantable que ha de usarse, y de este modo corresponde a un órgano, una válvula o un vaso prefabricado. El armazón debe ser biocompatible e implantable bien quirúrgicamente o bien percutáneamente. La presente invención prevé armazones tanto con como sin separadores intraluminales.

Los ejemplos de matrices adecuadas para el uso en el contexto de la presente invención incluyen armazones artificialmente producidos y moldeados, que pueden ser de polímero sintético o de material biológico tal como colágeno o fibrina, y armazones naturales tales como material radicular acelular o material natural entrecruzado tal como pericardio (Figura 1). Una matriz biológica incluye una matriz obtenida de novo a partir de material biológico (tal como gel de fibrina humana) así como una matriz que conserva la estructura de origen, tal como, pero no limitada a, raíz aórtica acelularizada. El material biológico puede ser autólogo (procedente del paciente en el que ha de implantarse el dispositivo), homólogo (p. ej. procedente de material humano si el implante ha de implantarse en un ser humano) o de origen heterólogo (p. ej. bovino, porcino u ovino en el caso de un implante en ser humano). La matriz biológica bien es reciente o bien se trata de tal modo que no comprometa el crecimiento de células sobre la superficie de la matriz o la flexibilidad de la matriz (p. ej. crioconservación, radiación UV, fotooxidación). Los injertos sintéticos pueden estar constituidos por materiales tales como poliéster, politetrafluoroetileno expandido (ePTFE) y otros materiales compuestos que son conocidos en la técnica. Concretamente, de acuerdo con la presente invención, la matriz sintética es un material biocompatible y biodegradable tal como mallas de poli(ácido glicólico) y polihidroxialcanoato, un poliéster termoplástico derivado de bacterias. Alternativamente, los dispositivos sintéticos pueden estar constituidos por materiales tales como poliéster, politetrafluoroetileno expandido (ePTFE) y otros materiales compuestos que son conocidos en la técnica.

De acuerdo con una realización particular de la presente invención, la matriz no es biodegradable y por consiguiente es duradera, para permitir la presencia y el funcionamiento prolongados dentro del organismo. Las matrices

derivadas de pericardio bovino de las que se han retirado las células (tales como Veritas® Collagen Matrix o SynerGraf®) están previstas dentro del contexto de la presente invención.

5 El "revestimiento" del factor o los factores de anidamiento sobre la matriz de acuerdo con la presente invención puede realizarse de varios modos. Entre los procedimientos de revestimiento, tres procedimientos de revestimiento son particularmente adecuados; para factores de anidamiento que se unen naturalmente a la matriz, puede usarse un procedimiento de impregnación. Esta unión dependerá tanto del factor de anidamiento como de la matriz. La impregnación implica una incubación de la matriz en una disolución comprendida por el factor de anidamiento en un disolvente apropiado tal como, pero no limitado a, solución salina tamponada con fosfato. Esta disolución es aplicable tanto para dispositivos prerrevestidos como para un kit de revestimiento que permite el revestimiento antes de la implantación en el quirófano.

10 Alternativamente, de acuerdo con la presente invención, se realiza un prerrevestimiento con colágeno soluble, albúmina, fibrinógeno o fibronectina. Esto es particularmente adecuado cuando se usan factores de anidamiento que interactúan con estas proteínas. Este método incluye un prerrevestimiento con una proteína de la matriz extracelular. Este prerrevestimiento se basa en interacciones con proteínas nativas entrecruzadas de la matriz y sus homólogos naturales. En una segunda etapa, los factores de anidamiento se unirán a continuación a estas proteínas de la matriz extracelular. De nuevo, este procedimiento puede aplicarse antes del transporte de los dispositivos implantables así como también como un formato de kit que permite el revestimiento en el quirófano.

15 Alternativamente, puede asegurarse un entrecruzamiento químico con o sin una molécula espaciadora entre la matriz y el factor de anidamiento. El espaciador puede ser un conector permanente o biodegradable, ya que una vez que las células se han anclado, la presencia de los factores de anidamiento es menos crítica. El factor puede entrecruzarse inmediatamente a la matriz siempre que siga siendo funcional. Otra realización implica un entrecruzamiento bioquímico con un brazo conector intercalado. La arquitectura específica de este brazo conector permite el control de la biodegradabilidad del entrecruzamiento y, como tal, la farmacocinética del factor de anidamiento añadido. Se han descrito en la técnica diferentes métodos para este entrecruzamiento. Un paradigma particularmente útil es el uso de un entrecruzamiento fotoquímico como el descrito en el documento EP 0820483B1, pero se prevén diferentes métodos de entrecruzamiento (p. ej. los métodos descritos en las publicaciones de patente EP0991944B1, EP1035879B1 y WO0159455A2).

20 De acuerdo con una realización particular de la invención, uno o más factores de anidamiento y/o factores quimioatrayentes y de movilización están presentes sobre la matriz en la forma de una proteína de fusión. Una proteína de fusión puede obtenerse mediante tecnología recombinante. A continuación, la proteína de fusión se elige específicamente para la interacción con la matriz, como tal la proteína de fusión comprende un radical orientador así como un radical de interacción con la matriz. Generalmente, una proteína de fusión es producida por un organismo anfitrión que se ha alterado genéticamente mediante la inserción de un gen, comprendido por la combinación de 2 genes que codifican cada uno una proteína específica. Esto permite la combinación de cualquiera de los factores de anidamiento mencionados anteriormente con una proteína que interactúa con la matriz entrecruzada. De nuevo, la última proteína en el constructo de la proteína de fusión puede ser el polipéptido completo o parcial de moléculas tales como, pero no limitadas a, colágeno, fibrinógeno o fibronectina. La proteína de fusión se selecciona en general por sus propiedades específicas de anidamiento de células y unión a la matriz. La proteína de fusión puede aplicarse al dispositivo implantable bien antes del transporte o bien en formato de kit inmediatamente antes de la implantación en el receptor.

25 Es necesario adoptar precauciones para evitar la desactivación de la proteína por cualquier tratamiento subsiguiente de la válvula (es decir, esterilización). Es preferible una técnica de esterilización que no altere significativamente la bioactividad de los agentes de movilización, el agente quimioatrayente o los agentes orientadores. Las condiciones de esterilización adecuadas que pueden conservar la actividad biológica de los agentes de movilización, el agente quimioatrayente o los agentes orientadores están presentes en la técnica, tal como la esterilización de la matriz cargada, p. ej., con una radiación gamma de baja dosis u óxido de etileno. Los métodos de esterilización particularmente adecuados son óxido de etileno a una temperatura seleccionada en el intervalo de 37 a 63°C o radiación con aproximadamente 1 a aproximadamente 3 mRad de radiación gamma o radiación de haz electrónico. Si el agente bioactivo es una proteína o un péptido, la actividad biológica puede optimizarse durante la esterilización con radiación gamma al incluir en la formulación 1) una proteína extraña, por ejemplo albúmina o gelatina; y 2) un captador de radicales libres (antioxidante), por ejemplo galato de propilo, 3-terc-butil-4-hidroxianisol (BHA) o ácido ascórbico, en cantidades eficaces para retardar la degradación inducida por radiación del péptido biológicamente activo. La esterilización se efectúa preferiblemente a baja temperatura, por ejemplo -70°C.

30 De acuerdo con otro aspecto, la presente invención se refiere a métodos para tratar a un paciente que tiene un tejido, vaso u órgano enfermo o dañado, tal como, pero no limitado a, un vaso sanguíneo o una válvula cardíaca enfermo o dañado, método que incluye implantar en dicho paciente el armazón de la presente invención revestido con uno o más factores de anidamiento.

De acuerdo con una realización concreta, el armazón se implanta para la siembra *in vivo*. Sin embargo, alternativamente, también se prevé la siembra *in vitro*. La siembra *in vitro* puede tener lugar en un biorreactor. Los biorreactores adecuados en el contexto de la presente invención son conocidos en la técnica e incluyen los descritos por Hoerstrup et al. (2002, Tissue Engineering 8(5): 863-870).

- 5 Las realizaciones concretas de los factores de anidamiento usados de acuerdo con la presente invención y las células ligadas a los mismos se ilustran en la Figura 4. Será evidente para los expertos en la técnica que pueden realizarse diversas combinaciones de factores de anidamiento. Por otra parte, también se prevén diversas modificaciones y variaciones en la fabricación y el uso de los armazones de la presente invención y en la construcción del sistema y el método.
- 10 Los armazones de la presente invención proporcionan ventajas particulares sobre los armazones de la técnica anterior, que implican numerosos riesgos según se ilustra en la Figura 3. Un primer riesgo es una exposición de las células del paciente a patógenos xenogénicos (p. ej. priones, virus y otros). El riesgo de agentes adventicios es introducido a través bien de enzimas proteolíticas o bien de medios de cultivo. Aunque estos factores son típicos para la fase *in vitro* de la ingeniería tisular de la válvula cardíaca, el riesgo no se limita a estas rutas de infección.
- 15 Otras rutas de infección son los materiales matriciales xenogénicos o la infección cruzada entre células de pacientes cuando se tratan en las mismas instalaciones. Las infecciones virales plantean algunos riesgos específicos, muchos de los cuales dependen de la cepa de infección, tales como la infección del paciente después de la implantación, la mutagénesis por inserción genómica del ADN viral y la función protooncogénica de proteínas virales que posiblemente inducen la inmortalización. La segunda familia de riesgos son el factor ambiental celular no fisiológico, al que las células se exponen bajo condiciones *in vitro*. Un ejemplo es el daño potencial al ADN inducido por la
- 20 tensión de oxígeno no fisiológica que induce estrés oxidativo. La conclusión es que cada uno de estos factores necesita probarse debido a que las células son "propias" y serán aceptadas por el sistema inmunitario del paciente ignorando su daño inducido potencialmente.

Breve descripción de los dibujos

- 25 Las siguientes Figuras ilustran la invención pero no han de interpretarse como una limitación de la invención a las realizaciones específicas descritas en ella.

Figura 1: Vista esquemática que muestra una visión de conjunto general de las elecciones del armazón de acuerdo con una realización particular de la presente invención. Un primer grupo son armazones moldeados. Estos usan materiales termoplásticos bien biológicos o bien no biológicos para crear un armazón valvular. En general, esto se logra utilizando un molde de vaciado en el que el material termoplástico se deja endurecer o mediante un procedimiento conocido como electrohilado. Otra opción es usar proteínas tales como colágeno o fibrina para crear tal válvula. Estas construcciones formadas por una proteína natural, obtenida, p. ej., de un paciente, son de origen alogénico o xenogénico o recombinantes. A continuación, estas proteínas se dejan interactuar entre sí en un molde para válvulas. El segundo grupo son los armazones naturales, es decir válvulas biológicas bien alogénicas o bien xenogénicas. Pueden distinguirse dos clases principales: (1) raíces aórticas acelularizadas y (2) prótesis entrecruzadas.

30

35

Figura 2: Diagrama esquemático que muestra el paradigma completo de la ingeniería tisular según se pone en práctica en la ingeniería tisular de válvulas cardíacas de acuerdo con una realización de la invención. Se realiza una construcción de válvula mediante la siembra de células apropiadas sobre un armazón apropiadamente elegido. Estas células pueden ser células endoteliales, fibroblastos o células intersticiales de válvula. La construcción valvular creada *in vitro* se pone a continuación en un biorreactor durante un cierto período de tiempo para madurar la construcción, mientras se acostumbra las células al incremento gradual del flujo y la presión. A continuación, la construcción madura se implanta generalmente después de algunas semanas en el receptor, donde puede someterse a remodelación *in vivo*.

40

45

Figura 3: Vista esquemática que muestra los riesgos del paradigma completo en la ingeniería tisular de válvulas cardíacas de acuerdo con una realización de la presente invención.

Figura 4: Vista esquemática que muestra las proteínas orientadoras y los receptores respectivos presentes sobre tipos de células específicos de acuerdo con una realización de la invención. El epítipo P1 o P2 de fibrinógeno interactúa con la integrina mac1 expresada por macrófagos. El factor de células pluripotenciales (SCF) se une al receptor de proteína tirosina quinasa (c-kit o CD117) de células pluripotenciales "mesenquimáticas" (MSC). El anidamiento de las células pluripotenciales hematopoyéticas (HSC) puede alcanzarse mediante diferentes interacciones. Esto se alcanza preferentemente por medio del factor derivado de estroma 1 (SDF-1) que se une a su receptor CXCR4. Las HSC también se ligan a fibronectina (FN) por medio de antígeno muy tardío (VLA) 4 ó 5, adicionalmente VLA-4 también se está uniendo a la molécula de adhesión a células vasculares

50

55

1 o VCAM-1. La última unión puede potenciarse mediante el inhibidor de proteasa pleiotrópico $\alpha 2$ -macroglobulina ($\alpha 2$ -MG).

- 5
Figura 5: Conformación esquemática de un armazón de la presente invención después de la siembra celular de acuerdo con un aspecto de la invención. Una proteína orientadora sobre la matriz interactúa con un receptor de una célula atraída. La especificidad de la unión celular se determina mediante la elección apropiada de la proteína orientadora.
- 10
Figura 6: Ejemplo de una laminilla sembrada espontánea (A) y una presembrada IP (B) de acuerdo con un aspecto de la invención. El Panel C muestra la recelularización (recuento celular total/longitud de la laminilla) de laminillas tanto sembradas espontáneas como presembradas IP en 1 semana y 1 mes *: $p < 0,05$.
- 15
Figura 7: Histología. Gráfica A: valor medio de sobrecrecimiento de laminillas tanto sembradas espontáneas como presembradas IP en 1 semana y un mes. Gráfica B: superficie mediana de matriz recientemente depositada sobre el pericardio bovino fotooxidado. Gráfica C: valor de la mediana de la longitud de la laminilla medida desde la superficie hasta la punta. *: $p < 0,05$
- 20
Figura 8: Caracterización de válvulas implantadas usando anticuerpos para marcadores celulares según se describe en la presente memoria en el Ejemplo 1. Los datos se presentan como la mediana [95% CI]. * indica la diferencia significativa entre los grupos de 1 semana; † indica diferencia significativa entre ambos grupos de control o entre ambos grupos sembrados IP; ‡ indica diferencia entre ambos grupos de 1 mes; § indica significativamente diferente de las muestras de prueba IP, e indica que no podía realizarse un análisis estadístico debido a que $n < 6$.
- 25
Figura 9: Porcentaje de células (A) VLA-4+, (B) CD44+ y (C) CD172a+ presentes en el material durante las diferentes fases de la FBR. Los puntos y las barras de error representan el promedio \pm desviación típica. a) significativamente diferente de 6 horas ($p < 0,05$); b) significativamente diferente de 6 horas, 1, 2 y 3 días ($p < 0,05$); c) significativamente diferente de 3 días ($p < 0,05$); d) significativamente diferente de 2 días ($p < 0,05$). Para CD172a, los datos de 6 horas se excluyen del análisis estadístico debido a datos de 2 ratas perdidos. La capacidad de unión y anidamiento de las células es alta, directamente después de la implantación, y generalmente disminuye posteriormente, excepto para un pico significativo en células CD172a+ el día 3.
- 30
Figura 10: Porcentaje de células pluripotenciales primitivas (A) CD133+ y (B) Sca-1+ y porcentaje de progenitores (C) CD34+ y (D) CD117+ presentes en el material durante las diferentes fases de la FBR. Los puntos y las barras de error representan el promedio \pm desviación típica. a) significativamente diferente de 5 días ($p < 0,05$); b) significativamente diferente de 3, 5 y 7 días ($p < 0,05$); c) significativamente diferente de 3 días ($p < 0,05$); d) significativamente diferente de 2 días ($p < 0,05$). Como puede observarse, las células pluripotenciales primitivas Sca-1+ tienen un pico en su presencia a las 6 horas después de la implantación, mientras que las células progenitoras CD34+ y CD117+ tienen un pico en su presencia a los 2 y 3 días después de la implantación.
- 35
Figura 11: Resultado obtenido de los perfiles de expresión génica determinados por microordenación de implantes intraperitoneales después de 1,5 y 3 días y macrófago peritoneal (IP) de acuerdo con un aspecto de la invención.
- 40
Figura 12: Resultados de la fracción de células CD117 (a) y Sca-1 (b) positivas presente en los controles e injertos de arteria carótida impregnados con SDF-1 y SCF (con o sin prerrevestimiento con FN). El asterisco indica diferencia significativa del control ($n=6$ en cada grupo) y # indica diferencia del grupo de SDF.
- 45
Figura 13: Presencia de células CD34+ (células pluripotenciales/progenitoras hematopoyéticas) sobre parches implantados en arterias de oveja.

Ejemplos

Ejemplo 1: Ingeniería de una válvula mediante implantación IP de un armazón

- 50
Para obtener una matriz sembrada para identificar los factores clave implicados en la adherencia de células apropiadas, se usó una reacción de cuerpos extraños inmadura para repoblar una matriz biológica entrecruzada, a saber pericardio bovino fotooxidado. Tal tipo de matriz asegura la durabilidad por sí mismo. En oveja, un armazón o parche implantado intraperitoneal (IP) de tres días se cubre con células similares a blastos con origen mesenquimático y diferenciación inmadura que podrían diferenciarse y normalmente lo harían en un fenotipo

miofibroblástico. Más particularmente, se encontró que estas células eran positivas para la vimentina pero negativas para actina del músculo liso α y miosina de la cadena pesada (véase la Tabla 1).

TABLA 1 Comparación entre siembra IP de 3 días en ovejas y ratas

	CD44	CD45	CD172a	Vimentina	ASMA
Oveja (n = 10)	0,0 [0,0, 0,0]	7,6 [2,2, 16,5]	52,0 [19,9, 82,8]	13,2 [7,5, 89,0]	0,8 [0,0, 15,4]
Rata (n = 6)	9,4 [1,6, 25,5]*	12,7 [11,3, 29,4]	32,1 [18,4, 41,8]	26,5 [20,5, 29,4]	0,2 [0,0, 1,2]

	SMMS-1	PPH3	CD34	Cd117
Oveja (n = 10)	0,0 [0,0, 0,0]	1,3 [0,2, 5,4]	1,5 [0,0, 7,2]	0,3 [0,2, 2,5]
Rata (n = 6)	0,0 [0,0, 0,0]	5,9 [1,7, 7,8]	7,3 [1,0, 15,0]	1,7 [0,8, 2,3]

5 * indica diferencia significativa entre la oveja y la rata ($p < 0,05$)

Se encontró que podía obtenerse una matriz estable con durabilidad probada que se diferencia en un fenotipo diferente en unos pocos días.

10 Se construyó una válvula del material madurado IP de oveja y se implantó en la arteria pulmonar de la oveja, y se determinó con respecto a la funcionalidad. Se implantaron 24 válvulas (12 controles no sembrados y 12 válvulas sembradas intraperitonealmente). En cada uno de los dos grupos se estudiaron 2 puntos temporales 1 semana (n = 6 por grupo) y 1 mes (n = 6 por grupo) después de la implantación en la arteria pulmonar. La función de la válvula se determinó mediante ecocardiografía. No se observaron anomalías. No se observó una formación importante de trombos en los injertos sembrados intraperitonealmente, mientras que se encontró 1 en el grupo de control.

TABLA 2 Datos de ovejas y ecocardiografía

	Control		Presiembra IP	
	1 semana	1 mes	1 semana	1 mes
Número	6	6	6	6
Edad	737 [362, 764]	706 [368, 722]	575 [452, 773]	653 [575, 719]
Peso	68 [64, 69]	66 [43, 72]	65 [59, 74]	68 [66, 77]
Gradiente pico (mmHg)	9 [8, 25]	11 [7, 20]	11 [9, 39]	10 [8, 39]
Función normal	6/6	6/6	6/6	5/6
PI	1/4 [0/4, 2/4]	1/4 [1/4, 1/4]	1/4 [0/4, 3/4]	1/4 [1/4, 2/4]
Trombo	0/6	1/6	0/6	0/6

15 Utilizando una tinción histológica, se encontró que había una notable diferencia en la celularización entre los controles y las construcciones valvulares sembradas intraperitonealmente. En contraste con los controles, se observó un depósito significativo de células y nueva matriz sobre la válvula sembrada intraperitonealmente, que también mostraba claramente una repoblación de la matriz original (véanse las Figuras 6 y 7). Criosecciones de 7

5 μm de la válvula explantada y muestras de control se tiñeron inmunofluorescentemente para CD44 (clon BAT 31A, VMRD Inc.), CD45 (clon 1.11.32, Serotec), CD172a (clon DH59B, VMRD Inc.), Vimentina (clon V9, DAKO), ASMA (clon 1A4, DAKO), SMMS-1 (clon SMMS-1, DAKO), Fosfohistona H3 (policlonal, CAMPRO scientific), CD117 (policlonal, ABCAM), eNOS (clon 3, BD Biosciences), MHC-I (clon H58A, VMRD, Inc), MHC-II (clon TH14B, VMRD, Inc y CD34 (clon QBEnd 10, DAKO).

10 [CD44: H-CAM, ácido hialurónico que se une a moléculas de la superficie celular; CD45: antígeno común de leucocitos; CD172a: es un marcador para monocitos y células pluripotenciales; Vimentina: es un marcador para células mesenquimáticas; actina del músculo liso alfa (ASMA): es un marcador para miofibroblastos y células del músculo liso; miosina de la cadena pesada (SMMS-1): es un marcador para células del músculo liso; Fosfohistona H3: es un marcador para la mitosis; CD117 es un marcador para células pluripotenciales; eNOS: es un marcador para el endotelio; MHC-I y MHC-II son marcadores para la respuesta inmunitaria; CD34: es un marcador para células progenitoras].

15 Se contaron las células que están presentes en y sobre el material matricial implantado, en una sección de laminilla completa. El control sembrado espontáneo tenía 3753 [995, 17254] y 3345 [1562, 4298] células por sección en 1 semana y 1 mes después de la implantación en la posición pulmonar, respectivamente. Por otra parte, las válvulas presembradas IP tenían 12126 [4571, 28216] y 20404 [4723, 32084] células por sección en 1 semana y 1 mes, respectivamente. Este incremento de cuatro a siete veces en el recuento de células entre válvulas presembradas espontáneas e IP era significativo.

20 Los porcentajes de células positivas encontrados en las secciones valvulares se resumen en la Tabla de la Figura 8. Los datos de todos los grupos y las tinciones se representan como valores de las medianas y un intervalo de confianza de 95%. Puesto que estos son porcentajes, solo se muestra la fracción de células positivas, teniendo en cuenta las grandes diferencias en las células totales observadas, son evidentes grandes diferencias en el recuento absoluto del tipo de célula.

25 Estos hallazgos ilustran claramente el potencial de estas células para revitalizar la matriz biológica estabilizada con miofibroblastos. Por otra parte, los implantes de 1 mes ya mostraban signos de reendotelialización espontánea. El proceso de recelularización parece ser autolimitante, ya que la cantidad de material recientemente depositado no se incrementa continuamente y está siendo cubierta por endotelio. Esto impide que nuevas células se adhieran y contribuyan al proceso de recelularización.

30 Aunque se ha usado matriz biológica estabilizada, las células obtenidas mediante siembra peritoneal son capaces de modificar esta matriz así como de depositarse por sí mismas.

Esta válvula biohíbrida construida de material matricial xenogénico y células autólogas combina la fiabilidad de la matriz con la viabilidad de las células. Las células son de origen mesenquimático y pueden diferenciarse en el fenotipo apropiado, miofibroblasto, para la repoblación celular. El presente estudio demuestra que la repoblación, aunque mediada o iniciada por macrófagos, deriva de células pluripotenciales (hematopoyéticas).

35 **Ejemplo 2: Atracción de células pluripotenciales a la matriz intraperitoneal**

El material matricial se introdujo intraperitonealmente en ratas y se investigó el tipo de células atraídas.

Animales

40 Se seleccionaron ratas Wistar macho (n = 36; 380-400 g). Se les dejó acceso a alimento ad libitum. Todos los animales se cuidaron de acuerdo con la "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (publicación NIH 85-23, revisada en 1985). El estudio fue aprobado por el Comité de Ética local.

Procedimiento

45 La anestesia se indujo con isoflurano al 4% en oxígeno al 100%, 1 l/min, durante 5 minutos y se mantuvo con isoflurano al 2% en oxígeno al 100%, 0,5 l/min, durante el procedimiento quirúrgico que duró aproximadamente 20 min. Después de afeitar y desinfectar, se realizó una incisión pararectal de aproximadamente 1,5 cm a través de la piel, los músculos abdominales y el peritoneo. La jaula de acero inoxidable que contenía el material matricial se insertó en la cavidad abdominal y se fijó a la pared abdominal con suturas transabdominales (Ticron 3-0). El peritoneo y los músculos abdominales se cerraron con una sutura corrida (Ticron 3-0) y la piel se suturó intradérmicamente (Ticron 3-0) para evitar la apertura de la herida por el acicalamiento. Después del procedimiento quirúrgico, la anestesia se interrumpió. Al cabo de de aproximadamente 5 min, los animales recobraron la conciencia y se colocaron en jaulas individuales.

50

Condiciones

La recuperación de los materiales matriciales se realizó a diferentes puntos temporales. Los diferentes tiempos de recuperación fueron 6 horas, 1, 2, 3, 5, y 7 días después de la implantación, dependiendo del grupo al que se asignara el animal. Para este fin, los animales se re-anestesiaron, se volvió a abrir la herida y se retiró la jaula.

5 Material

La matriz recuperada se embebió en medio para Congelación de Tejidos (Leica – Van Hopplynus instruments, Bruselas, Bélgica), se congeló instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C. Se realizaron criosecciones en un criostato Microm HM500 OM (Prosan, Merelbeke, Bélgica). Las secciones de 7 µm se colocaron sobre portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina y se almacenaron a -20°C hasta su tinción.

10 Antes de la tinción, el material se fijó en acetona enfriada con hielo durante 10 min. Posteriormente las secciones de matriz se tiñeron inmunohistoquímicamente con anticuerpos. Los anticuerpos primarios se detectaron con anticuerpos secundarios conjugados con FITC. Se tomaron fotografías a la temperatura ambiente utilizando un microscopio óptico Axioplan 2 con una cámara Zeiss Axiocam MRc5 (Zeiss; Zaventem, Bélgica). Las lentes del objetivo utilizadas fueron Plan-NEOFLUAR 1x/0,025, Plan-APOCHROMAT 10x/0,45 y 20x/0,75. El análisis de las imágenes se realizó con Axiovision Rel. 4.4.

15 Para estudiar los fenotipos celulares (inmunohistoquímica) con detalle, se agruparon de acuerdo con su función o su especificidad. La densidad y la proliferación celulares fueron estudiadas a 6 puntos temporales diferentes (n = 6 por punto temporal) después de la implantación intraperitoneal.

Tabla 3: Recuento celular y proliferación in situ

	Tiempo de implantación					
	6h	1d	2d	3d	5d	7d
Recuento celular (células/mm)	128 ± 55 ^b	397 ± 181 ^{ab}	377 ± 148 ^{ab}	722 ± 489 ^a	743 ± 392 ^a	569 ± 331 ^a
PPH-H3 (%)	0,708 ± 1,229 ^c	0,601 ± 1,104 ^c	0,869 ± 1,869 ^c	5,44 ± 2,26	1,68 ± 1,94 ^c	0,505 ± 0,871 ^c

20 Los datos se representan como el promedio ± desviación típica. a diferencia significativa de 6 horas (p<0,05); b diferencia significativa de 5 días, (p<0,05); c diferencia significativa de 3 días (p<0,05);

25 La Tabla 3 demuestra que las células están presentes sobre el material implantado completamente acelular de 6 horas después de la implantación intraperitoneal en adelante. En los implantes, se puede observar un incremento general en el número de células a lo largo del tiempo, volviéndose significativo desde el día 1 en adelante. A los 7 días de la implantación, se observa un incremento de más de 4 veces en el número de células. El marcador utilizado para evaluar in situ la proliferación celular, la fosfohistona H3 (PPH-H3), muestra un pico significativo de aproximadamente 5% en la proliferación celular in situ el día 3 después de la implantación. Excepto por la presencia del pico en la proliferación celular el día 3, estos datos apoyan una neogénesis de tejido por influjo celular en lugar de por división celular. Solamente el día 3 la proliferación celular parece contribuir al incremento de la celularidad.

30 Se evaluaron la unión celular y la capacidad de anidamiento con anticuerpos para VLA-4 (CD49d), CD44 y CD172a o una proteína reguladora de la señal alfa (SIRP). La Figura 9 demuestra que las células VLA4+ estuvieron claramente presentes en la primera fase de la FBR que comprendía apenas 20% de la población celular y que esta fracción disminuye significativamente hasta aproximarse a la ausencia después de 5 días de la implantación intraperitoneal. Las células CD44+ muestran una presencia al inicio similar pero disminuyen significativamente los días 2, 5 y 7, en comparación con las mediciones a las 6 horas, pero mantienen su presencia en aproximadamente 10% hasta el día 7. Los datos de CD172a muestran un patrón similar de presencia de estas células, situado en el mismo orden de magnitud que los datos de CD44, excepto por el hecho de que el descenso no está significativamente presente y de que un pico pequeño pero estadísticamente significativo está situado el día 3. VLA-4 (CD49d), encontrado en las células T, células B, timocitos, células pluripotenciales hematopoyéticas CD34+ y células endoteliales, es una molécula de integrina que se une a la molécula de adherencia celular vascular-1 (VCAM-1) sobre el estroma de la médula y está implicada en el anidamiento de las células pluripotenciales y progenitoras en el estroma de la médula (Krause et al. (1996) Blood 87, 1-13). VLA-4 también media el anclaje de las células progenitoras hematopoyéticas a la fibronectina (Levesque (1999) Exp. Hematol. 27, 579-586). Se ha demostrado que CD44, una molécula de adherencia sobre leucocitos, células progenitoras hematopoyéticas (Netelmbos et al. (2002) J. Leukoc. Biol. 72, 353-362) y células pluripotenciales mesenquimáticas (Rombouts y

Ploemacher (2003) *Leukemia* 17, 160-170), media las interacciones célula-célula y célula-ECM, juega un papel en el tráfico de leucocitos a lugares de inflamación y co-estimula la activación de linfocitos y la infiltración de tejidos (Wu et al. (2005) *Cell Res.* 15, 483-494). Además, las interacciones del proteoglicano de la superficie celular CD44 con el glicosaminoglicano de la matriz extracelular hialuronano (HA) son eventos clave en la inflamación (Levesque et al. citado más arriba). Los niveles elevados de fracciones celulares tanto VLA-4+ como CD44+ inmediatamente después de la implantación son claramente indicativos de un aumento de la unión celular y de la capacidad de anidamiento mediadas por estas moléculas que disminuye significativamente durante las fases tardías cuando las células comienzan a diferenciarse, lo que también se observa en el número absoluto de células.

Sobre todo, se estudiaron 4 marcadores expresados predominantemente por las células pluripotenciales/progenitoras: CD133, antígeno de células pluripotenciales-1 (Sca-1), CD34 y CD117 (c-kit) (véase la Figura 10). La fracción de células CD133+, que representa la célula pluripotencial más primitiva estudiada (Gehling et al. (2000) *Blood* 95, 3106-3112) era muy pequeña, alcanzando su máximo de 2,3% en 1 rata al cabo de 3 días de la implantación. Se sabe que Sca-1 es presentado por células pluripotenciales hematopoyéticas y mesenquimáticas primitivas. Durante la fase temprana de la implantación intraperitoneal se encontró aproximadamente 7% de estas células. CD34 y c-kit (CD117) son ambos marcadores para las células pluripotenciales y progenitoras hematopoyéticas circulantes (Okamoto et al. (2005) *Blood* 105, 2757-2763). C-kit también es expresado en células pluripotenciales mesenquimáticas. El perfil temporal de las células CD34+ muestra un incremento gradual en la fracción de estas células encontradas en el material del implante, alcanzando un valor pico significativo de aproximadamente 5-8% en los días 2 y 3. Es notable el muy rápido regreso a bajos niveles de las células CD34+ ya evidente el día 5, seguido de nuevo de un incremento significativo hacia el día 7. El patrón de c-kit muestra un nivel elevado significativo de aproximadamente 2% los días 2 y 3. La expresión de CD133, un antígeno de la superficie celular transmembrana, está restringido a un subgrupo de células pluripotenciales y progenitoras CD34+ (Buhning et al. (1999) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 872, 25-38) y a las células precursoras endoteliales (Gehling et al. 2000, citado más arriba). Adicionalmente, es expresado por una pequeña porción de aproximadamente 0,2% de las células CD34- (Gallacher et al., citado más arriba). Las células CD34+CD133+ están enriquecidas en células progenitoras primitivas y mieloides, mientras las células CD34+CD133- consisten principalmente en células B y progenitores eritroides tardíos (Buhning et al. 1999, citado más arriba). El antígeno CD133 está presente esporádicamente en los parches implantados, sugiriendo una contribución muy limitada de estas células primitivas a la formación de nuevo tejido en FBR. Sca-1 es expresado en células pluripotenciales hematopoyéticas primitivas multipotentes en médula ósea y en sangre periférica, así como en células pluripotenciales mesenquimáticas. Las células Sca-1+ son más primitivas que las células Sca-1- y responden mejor a una combinación de factores hematopoyéticos, incluyendo SCF y células estromáticas (Okada et al. (1992) *Blood* 80, 3044-3050; Rombouts y Ploemacher citado más arriba; Spangrude et al. (1991) *Blood* 78, 1395-1402). Curiosamente, se observó una fracción bastante grande de estas células inmediatamente después de la implantación y un descenso gradual en las fases tardías. Se observó un pico en el número absoluto de células 2 días después de la implantación. Tomados juntos, los hallazgos indican claramente que estas células contribuyen de una manera principal y temprana a la reacción FBR.

Se utilizaron tanto CD34 como CD117 como marcadores para células pluripotenciales y progenitoras más comprometidas en comparación con CD133 y Sca-1. El marcador CD34, una proteína de membrana de cadena sencilla, indica la presencia de células pluripotenciales/progenitoras hematopoyéticas, células precursoras endoteliales y células endoteliales capilares. C-kit (CD117), un miembro de la familia de receptores tirosina quinasa y el receptor del factor de células pluripotenciales (SCF), es expresado sobre células pluripotenciales primitivas hematopoyéticas y células progenitoras comprometidas (Okada et al. citado más arriba), sobre las células inmaduras circulantes (Taguchi et al. (2004) *Circulation* 109, 2972-2975) y sobre las células pluripotenciales mesenquimáticas (Rombouts y Ploemacher citado más arriba). Estos resultados mostraron un nivel temporalmente elevado de células tanto CD34+ como c-kit+ a los 2 y 3 días de la implantación, que fue especialmente pronunciado en las fracciones de células CD34+. Estas células mostraron un claro pico el día 3 que se aproximaba a la fracción inicial de las células Sca-1+. Estos hallazgos se pueden explicar o bien por la diferenciación de las células Sca-1+ en células c-kit+ o CD34+ más comprometidas o bien por el reclutamiento temporal de estos tipos de células desde el torrente sanguíneo por medio de factores de señalización liberados de otras células presentes en la fase temprana de la FBR, probablemente los macrófagos. Puesto que el número absoluto de células CD34+ en su pico supera con mucho el recuento de células Sca-1 absoluto, la última explicación es más aceptable.

Por medio de la presente invención se ha descubierto sorprendentemente en un modelo de implantación intraperitoneal de rata que durante la reacción a cuerpos extraños inmadura, las células pluripotenciales y las células progenitoras son atraídas hacia el tejido y son implicadas activamente en la repoblación de la matriz con (mio)fibroblastos.

Ejemplo 3: Expresión génica específica en neogénesis tisular.

Como se ha mencionado antes, se estudió la neogénesis tisular que se produce en la FBR en modelos animales adultos, debido a que es capaz de producir tejido laminar con un componente celular similar a estructuras vasculares tales como las válvulas cardíacas (Butler et al. 2001a citado anteriormente; Butler et al. 2001b citado

anteriormente). Desafortunadamente el tejido maduro no es una solución ideal ya que requeriría la construcción de una prótesis valvular en el quirófano, un método proclive a variaciones en la calidad de la válvula (Grabenwoger et al. (2000) J Heart Valve Dis 9, 104-109). Sin embargo, la neogénesis tisular *in se* es un rasgo interesante debido a que contiene todos los componentes, esto es, las células (ejemplo 2), la nueva matriz extracelular, los componentes de señalización y las proteínas de anidamiento, necesarios para construir un nuevo tejido. Se identificaron las proteínas de anidamiento, moléculas responsables de la unión física de las células a la matriz extracelular.

De un modo similar al ejemplo 2, se suspendió pericardio bovino fotooxidado, una matriz completamente acelular y entrecruzada, en una jaula de acero inoxidable y se implantó en la cavidad abdominal de ratas Wistar. Se han estudiado dos períodos de implantación diferentes (1,5d y 3d) con 2 ratas en cada grupo. Los implantes fueron recuperados después de 1,5 d o 3 d, dependiendo del grupo al cual se asignara el animal. Para este propósito los animales fueron re-anestesiados, la herida se volvió a abrir y la jaula se retiró. Tras la recuperación el parche de matriz se colocó inmediatamente en reactivo de estabilización de ARN RNAlater (Qiagen) hasta la extracción del ARN.

La expresión génica de fondo, esto es, la expresión génica de macrófagos, se obtuvo a partir de macrófagos intraperitoneales inducidos con tioglicolato (2 ml de tioglicolato al 3% en solución salina estéril y esterilizado por filtración) de 3 ratas.

Se extrajo el ARN total utilizando reactivo TRizol (Invitrogen) seguido de purificación adicional utilizando RNeasy Mini Spin Columns (Qiagen). El ARN total se controló para determinar su integridad y pureza utilizando Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) y un espectrofotómetro Nanodrop en las instalaciones de Microordenación del VIB (Flemish Interuniversity Institute for Biotechnology), respectivamente. Las sondas se prepararon a partir de 5 µg de ARN total, que no mostraba signos de degradación o impurezas (260/280 y 260/230 > 1,8), de acuerdo con las pautas de Affymetrix. En resumen, a partir del ARN total, se sometió a transcripción inversa el ARN poli-A utilizando un cebador poli dT-T7 y se marcó durante una reacción de transcripción *in vitro* de T7 utilizando el Kit de Marcaje Affimetrix IVT (núm. de catálogo 900449, Affymetrix, High Wycombe, Reino Unido). Las sondas se purificaron (GeneChip Sample Cleanup Module, núm. de catálogo P/N 900371, Affymetrix, Reino Unido) y se analizaron de nuevo para determinar el rendimiento (30-120 µg) y la pureza (260/280 y 260/230 > 1,8). Se fragmentaron 20 µg con hidólisis alcalina. El ARN fragmentado se volvió a suspender con adiciones de control en 300 µl de tampón de hibridación (Eukaryotic Hybridization Control Kit, núm. de catálogo 900299, Affymetrix, High Wycombe, Reino Unido) y se hibridó una sonda de 200 µl en un horno con grill a 45°C. Los chips génicos (Affymetrix GeneChip Rat genome 230 2.0 Array, Affymetrix, Reino Unido) se lavaron y se tiñeron en GeneChip Fluidics Station 400 (Affymetrix, Reino Unido) utilizando el protocolo EukGE-WS2v4, y con posterioridad se escanearon con el GeneChipScanner 3000 (Affymetrix, Reino Unido). El análisis de las imágenes se realizó en GCOS.

El experimento se realizó por triplicado utilizando muestras no reunidas obtenidas de un animal diferente. El análisis de las imágenes se realizó en GCOS. Los valores de intensidad de la sonda que superaban el nivel del fondo con una significación $p < 0,05$ se consideraron algoritmos de presencia. El análisis funcional de los datos de la microordenación se realizó utilizando Onto-Express que clasifica los genes de acuerdo con las categorías de Gene Ontology. [Draghici et al (2003) Nucleic Acids Res. 31, 3775-3381].

Como se ilustra en el ejemplo 3, se produce una reacción primaria seguida de una acumulación tanto de moléculas de la matriz extracelular como de proteínas de anidamiento, proporcionando sitios de anclaje celular, el día tres.

Para el análisis se consideraron todos los genes (± 31000) presentes en el chip de microordenación. El diagrama de venn (Figura 11) proporciona una visión general del descubrimiento de la expresión del gen. Comparando los perfiles de expresión para FBR e IP, se encontraron los genes específicos 3868 FBR3 y 2957 FBR1.5 (origen no macrófago). Los genes de principal interés codifican las proteínas de la matriz extracelular y las proteínas de señalización que permiten la atracción y el anidamiento de las células pluripotenciales, que se ha demostrado que están implicadas en la FBR inmadura. Aunque se encontró una señal significativa para las moléculas estructurales, entre las cuales están diferentes colágenos y lamininas, tanto en FBR1.5 como en FBR3, la expresión general de estas moléculas agrupada por GO solamente resultó significativa en el último grupo. Esto significa que independientemente de la expresión de algunas moléculas estructurales en el grupo FBR1.5, la contribución significativa de esos genes solamente se encontró en el grupo FBR3, que es posterior al anidamiento celular. En FBR3 y FBR1.5 los genes 85 y 116 respectivamente fueron atribuidos al período GO de actividad del transductor de la señal, entre los cuales se encuentra el factor derivado de células del estroma gamma 1 (SDF-1), una molécula que se une a células pluripotenciales hematopoyéticas y por lo tanto un candidato interesante para su integración en una matriz biológica.

A partir de estos resultados parece que tanto SDF-1 como SCF estuvieron presentes en esta neogénesis tisular adulta y que ambos son proteínas de anidamiento candidatas para su estudio en el anidamiento de células pluripotenciales/progenitoras *in vivo* en prótesis vasculares/valvulares.

Ejemplo 4: Injertos de arteria carótida en ratas.

Se evaluó la resiembra potencial de los materiales nanorecubiertos injertando un injerto vascular de pequeño calibre en la arteria carótida común como una interposición. Los injertos fueron elaborados a mano de pericardio fotooxidado con SDF-1 o SCF a 1 µg/por tubo (en 30 µl de PBS) con o sin recubrimiento previo del pericardio bovino con fibronectina. El injerto permaneció en su lugar solamente durante 24 horas, suficiente para lograr la adherencia celular pero no suficiente para producir la diferenciación de las células, lo que podría dar como resultado la pérdida de sus propiedades como células pluripotenciales. Se prepararon tubos de pericardio bovino con un diámetro interno que se aproximaba al diámetro interno de una arteria carótida de rata. El injerto se manufacturó haciendo rodar un pequeño parche del elemento fotooxidado sobre una cánula de plástico de pequeño calibre y suturando los bordes longitudinales utilizando técnicas microquirúrgicas. La longitud del injerto fue de aproximadamente 5 mm y el diámetro interno fue 10 veces más pequeño. Comparando el diámetro interno del injerto con el diámetro interno de la arteria carótida común se reveló que el diámetro del injerto es aproximadamente 20% mayor. Se seleccionó este diámetro mayor porque los implantes preliminares permanecieron patentes durante varias semanas.

El protocolo de implantación es una adaptación del protocolo para conejos publicado por Boeckx (1997) Ann. Thorac. Surg. 63, S128-S134). Se anestesiaron ratas Wistar macho (n = 6 por cada grupo de material) de 380 a 400 g con isoflurano (inducción: 4%; Cirugía: 2%). Después de afeitar y desinfectar con alcohol yodado, se diseccionó la arteria carótida común liberándola del tejido circundante y se montó en una grapa microvascular de tipo Acland. A continuación la arteria se seccionó transversalmente y tanto la zona proximal como distal del constructo del injerto se suturaron con un monofilamento de nailon 10/0, utilizando la técnica de la puntada a las 7 (Kirsch et al. (1992) Am. Surg. 58, 722-727) que requiere de 9 a 12 puntadas. La aguja cogió todo el grosor de la pared del vaso. Se tuvo cuidado de que solamente la aguja tocara la íntima de la arteria. El procedimiento global se realizó sin espasmolíticos (p. ej. papaverina) ni anticoagulantes (p. ej. heparina). Después de la última puntada se retiró la grapa microvascular doble de tipo Acland. Tras unos minutos para asegurar la completa hemostasis, se cerró la piel. La anestesia se interrumpió y aproximadamente 5 minutos más tarde el animal se despertó y se transfirió a una jaula individual.

Al cabo de 24 horas la herida se volvió a abrir y el injerto se pre-elevó y se lavó con solución salina tamponada con fosfato. El injerto y sobre cada anastomosis una pequeña porción de la arteria carótida nativa se extirparon. El lumen se enjuagó suavemente con solución salina tamponada con fosfato y con posterioridad se cargó con medio para Congelación de Tejidos. Después de haber sido embebida en el mismo medio la muestra se congeló instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C. El seccionamiento se realizó en un criostato Microm HM500 OM (Prosan, Merelbeke, Bélgica). Las secciones longitudinales de µm se colocaron sobre portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina y se almacenaron a -20°C hasta su tinción.

Se hizo hincapié en la atracción de las células pluripotenciales, por lo tanto las muestras fueron teñidas inmunohistoquímicamente para 4 marcadores; CD3 (BD Pharmingen; clon G4, 18), c-kit (Santa Cruz Biotechnology; clon H-300), CD34 (DAKO; clon QBEnd 10), Sca-1 (R&D Systems; policlonal de cabra). La siguiente Tabla indica los tipos de células teñidas para cada anticuerpo.

Tabla 4: Anticuerpos utilizados para la tinción celular

Marcador	Sinónimos	Tipos celulares
CD3		Células T (Nicolls et al. citado más arriba)
CD117	c-kit, receptor SCF	Subgrupo de células pluripotenciales (Buhning et al, citado más arriba; Gehling et al. citado más arriba)
CD34		Células progenitoras hematopoyéticas (Askari et al. (2003) Lancet 362, 697-703; Okada et al. citado más arriba), células inmaduras circulantes (Taguchi et al. citado más arriba), células pluripotenciales mesenquimáticas (Rombouts y Ploemacher citado más arriba)
Sca-1	Antígeno de células pluripotenciales	Células pluripotenciales (Krause et al. citado más arriba)

Todos los anticuerpos primarios fueron detectados con un anticuerpo conjugado con fluorocromo, FITC o rojo texas. El análisis de las imágenes se realizó utilizando un microscopio Axioplan 2 imaging (Zeiss, Zaventem, Bélgica) y el paquete de programas Axiovision 4.4 (Zeiss, Zaventem, Bélgica). Para la determinación de los fenotipos celulares se evaluaron un total de 250 células para determinar cada sección longitudinal y los resultados se expresaron como un

porcentaje. Para evitar distorsiones se tomaron varias fotografías, se dividieron en cuatro y se sometieron a recuento de acuerdo con una enumeración al azar.

En conjunto, no se encontraron diferencias en la adherencia celular cuantitativa (Tabla 5).

Tabla 5: Datos del recuento celular

	Control	SCF	FN+SCF	SDF-1	FN+SDF-1
Recuento celular	2276	3212	1299	2316	1697
	[158, 5490]	[1293, 4324]	[1044, 2812]	[1619, 3359]	[969, 2861]

5 Se encontraron células CD34 positivas en dos grupos. Estas células estaban presentes en los controles (1,85 [0,00, 7,21]%) que solamente se habían sometido a siembra espontánea después de la implantación en el vaso sanguíneo de rata. Además, se demostró que estaban presentes en pericardio bovino fotooxidado impregnado con SCF (3,84 [0,00, 11,08]%), aunque se encontró un incremento numérico éste no fue significativo debido a la gran variación entre individuos. Los tres grupos restantes no contenían células CD34+.

10 Los resultados de la inmunotinción de CD117 se muestran en la Figura 12(A). Las muestras de control compuestas de pericardio fotooxidado mostraron una presencia media de 4,70 [2,14, 12,17]% de células CD117+ después de haber sido implantadas en la arteria carótida de una rata. Impregnando el mismo material matricial con SCF o SDF-1 aumentó significativamente la fracción de células CD117+ en y sobre el lado luminal de los implantes. Se encontró una fracción de 15,78 [10,04, 47,90]% y 34,02 [26,32, 37,39]% para SCF y SDF-1, respectivamente. Aunque la co-impregnación con fibronectina no tuvo efecto sobre la presencia de células CD34+ y Sca-1+, se halló un claro incremento en el anidamiento de las células CD117+. La co-impregnación de fibronectina y SCF dio como resultado una fracción de 47,84 [41,10, 10,66]% de células CD117+. Aunque se encontró un gran incremento numérico éste no fue significativo debido a la gran variación en la fracción de CD117+ en el grupo con SCF. Por otra parte, se descubrió que el incremento encontrado en la fracción CD117+ en el grupo co-impregnado con fibronectina y SDF-1 (48,90 [42,32, 54,08]%) fue significativo cuando se comparaba con el grupo con SDF-1. En general se halló que todos los protocolos de impregnación inducían un aumento del anidamiento de las células CD117 positivas y que especialmente las combinaciones de SCF o SDF-1 con fibronectina daban como resultado que alrededor de 50% de las células fueran positivas para este marcador.

25 Finalmente, se investigó la atracción de las células pluripotenciales Sca-1+ hacia el pericardio bovino fotooxidado recubierto con SDF-1 o SCF con o sin un pre-recubrimiento de fibronectina (véase la Figura 12b). En el control se encontraron algunas células Sca-1 positivas en 2 de 6 implantes. Cuando el mismo material matricial se impregnó esto dio como resultado una adherencia de las células Sca-1 positivas en todos los implantes así como un incremento significativo en el porcentaje de células Sca-1 positivas. Las células Sca-1 positivas pueden ser atribuidas al grupo de células pluripotenciales o a un subgrupo de células T. Se observó que la tinción para las células T (inmunohistoquímica anti-CD3) era negativa en todos los implantes confirmando de ese modo el anidamiento específico de las células pluripotenciales Sca-1 positivas en el material impregnado.

Ejemplo 5: Parches implantados en arteria carótida de oveja

35 Se han implantado parches de pericardio bovino impregnado con SCF y SDF-1 en arteria carótida de oveja. Ambas proteínas se han utilizado con o sin un recubrimiento anterior del material matricial con fibronectina. Se han implantado cuatro parches en cada arteria carótida (derecha e izquierda). En cada lado se implantaron parches recubiertos de control, 1 µg, 3 µg y 10 µg por cm². El control se implantó aguas abajo y con posterioridad se implantaron parches de 1, 3 y 10 µg/cm² con el parche de 10 µg/cm² en la posición más aguas arriba. La Figura 13 demuestra que se encontraron algunas células CD34+ (células pluripotenciales/progenitoras hematopoyéticas)

40

REIVINDICACIONES

- 5 1. El uso de un factor de anidamiento capaz de unirse a células pluripotenciales o células progenitoras en la preparación de un armazón que tiene una matriz estructural, donde el uso de dicho armazón con un factor de anidamiento es para dirigir la siembra celular *in vivo in situ*, y donde dicho factor de anidamiento es un ligando de un receptor, o un fragmento de dicho ligando que comprende el dominio de unión al receptor, o un péptido que se une al receptor.
- 10 2. Un método para preparar un armazón que tiene una matriz estructural, para la siembra celular *in vivo in situ* directa, comprendiendo dicho método la etapa de aplicar a dicha matriz estructural un factor de anidamiento capaz de unirse a células pluripotenciales o células progenitoras, donde dicho factor de anidamiento es un ligando de un receptor, o un fragmento de dicho ligando que comprende el dominio de unión al receptor, o un péptido que se une al receptor.
- 15 3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 o el método de acuerdo con la reivindicación 2, donde dicho ligando se selecciona del grupo que consiste en factor derivado de estroma 1, factor de células pluripotenciales, VCAM-1, región P1 de fibrinógeno y región P2 de fibrinógeno.
- 15 4. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 o el método de acuerdo con la reivindicación 2, donde dicho ligando es factor derivado de estroma 1.
- 20 5. El uso o el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para la recelularización *in vivo* directa en condiciones de alto estrés por cizalladura.
- 20 6. El uso o el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde dicho armazón es un armazón de un vaso sanguíneo o válvula cardíaca.
- 25 7. El uso o el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la matriz es recubierta previamente con una o más de las proteínas que facilitan la interacción entre el ligando o el fragmento del mismo y la matriz estructural.
- 25 8. El uso o el método de acuerdo con la reivindicación 7, donde la proteína que facilita la matriz se selecciona del grupo que consiste en fibronectina, colágeno y fibrinógeno.
- 30 9. El uso o el método de acuerdo con la reivindicación 7, donde la proteína que facilita la matriz es la fibronectina.
- 30 10. El uso o el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde la matriz estructural es una prótesis no entrecruzada o raíces aórticas acelularizadas.
- 30 11. El uso o el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde el factor de anidamiento se aplica sobre la matriz estructural mediante entrecruzamiento químico o mediante impregnación de la matriz con una disolución que comprende el factor de anidamiento.

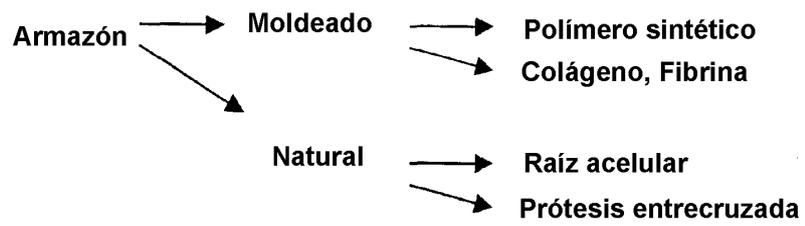


Figura 1

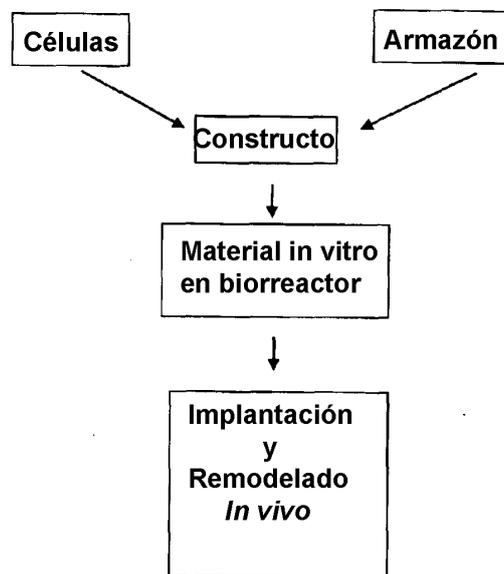


Figura 2

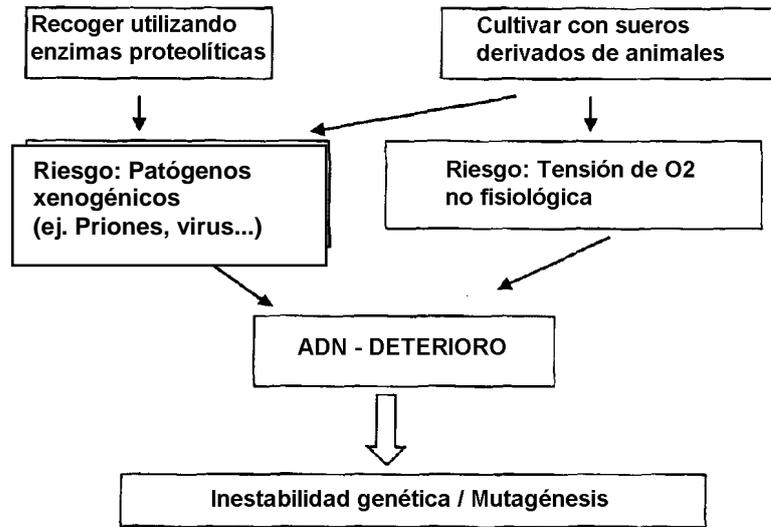


Figura 3

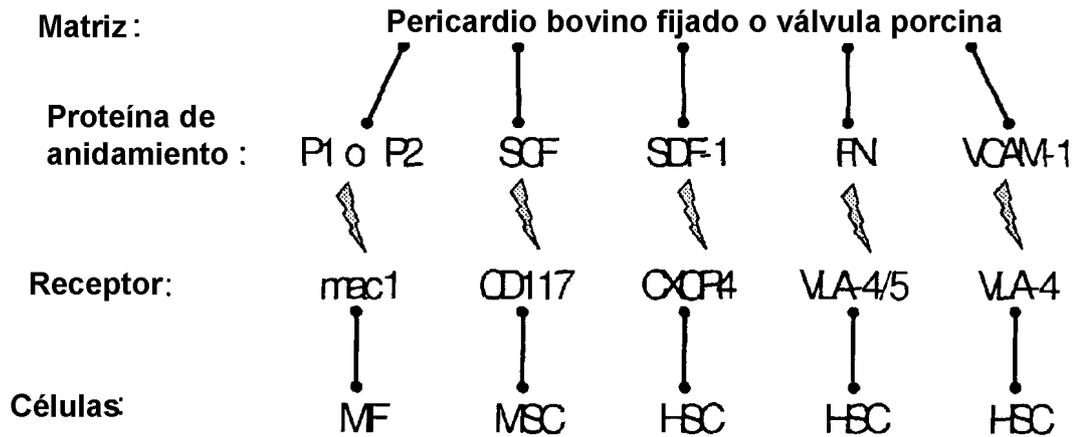


Figura 4

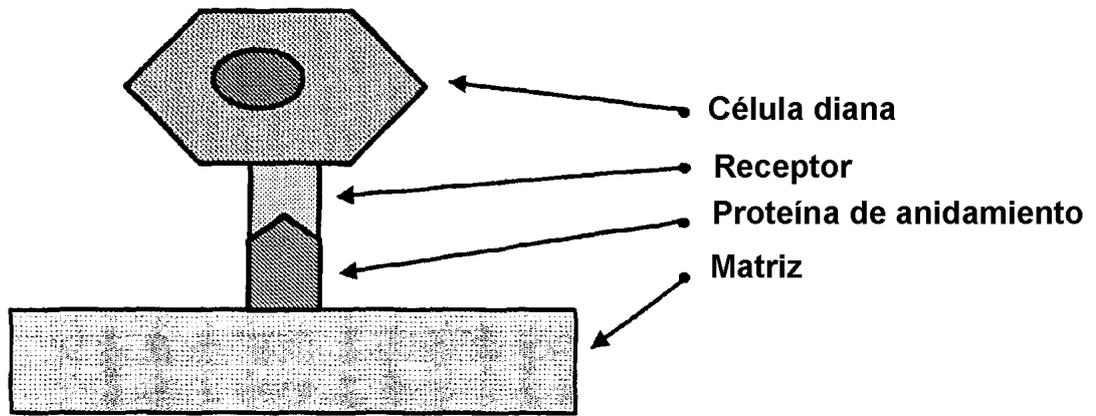


Figura 5

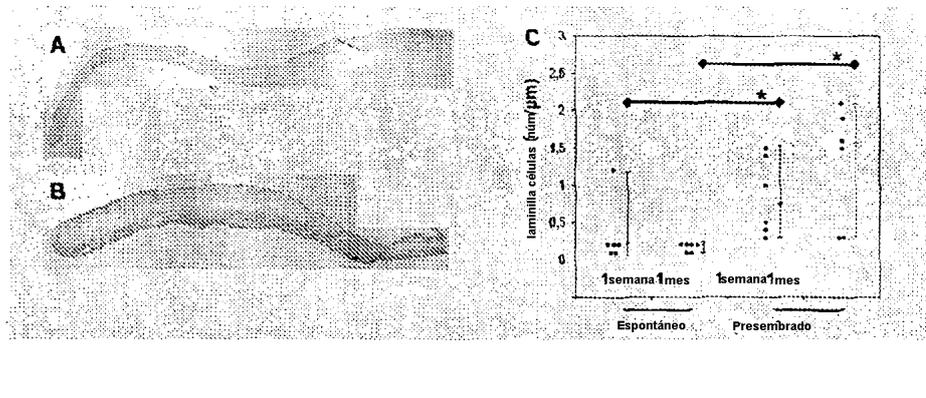


Figura 6

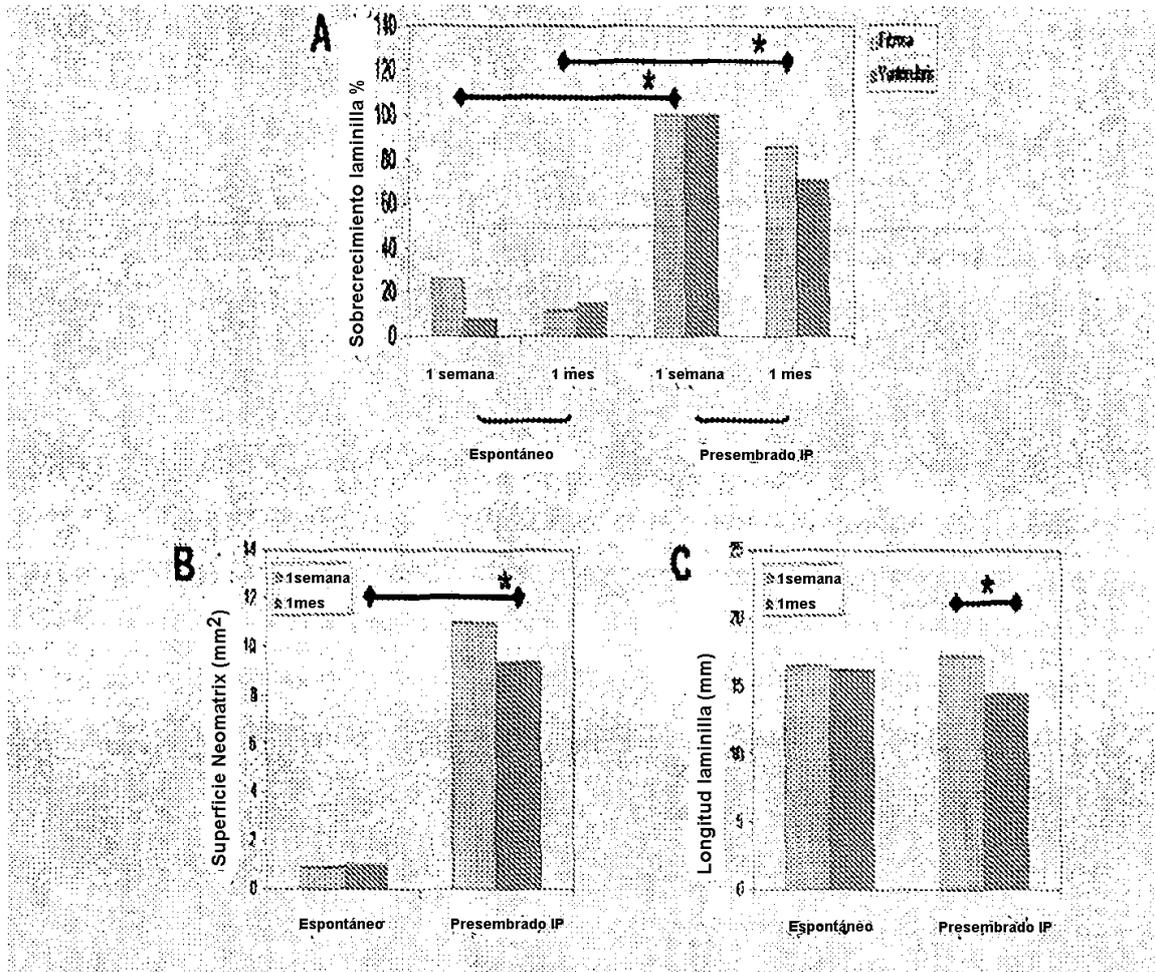


Figura 7

Período in situ	Espontáneo		Muestras Ensayo IP		Presiembra IP	
	1 semana	1 mes	3 días	1 semana	1 mes	
CD45 (%)	4,23 [2,11, 9,51]	5,32 [1,14, 14,07]	7,56 [2,64, 14,09]	11,10 [3,95, 17,69]	6,05 [4,37, 17,53]	
CD44 (%)	4,81 [1,44, 13,33]	17,03 [8,45, 32,75]†	0,00 [0,00, 0,00]	4,65 [1,95, 8,21]§	8,40 [0,00, 15,72]§	
MHC-I (%)	0,69 [0,00, 5,56]	1,47 [0,00, 3,27]	0,17 [0,00, 6,81]	2,55 [1,52, 8,33]*	1,42 [0,93, 6,06]	
MHC-II (%)	0,00 [0,00, 0,00]	0,00 [0,00, 2,75]	0,00 [0,00, 1,43]	0,10 [0,00, 1,60]	0,00 [0,00, 1,28]	
Fosfohistona H3 (%)	1,29 [0,33, 1,6]	0,74 [0, 2,39]	1,30 [0,18, 5,37]°	1,13 [0,44, 1,88]	0,85 [0,45, 1,79]	
Vimentina (%)	18,73 [11,76, 29,11]	86,78 [32,38, 93,77]†	13,25 [8,20, 73,60]	59,49 [12,25, 91,27]*	64,85 [30,00, 78,14]§	
ASMA (%)	4,83 [1,17, 14,09]	33,07 [2,00, 47,41]†	0,78 [0,00, 13,67]	34,12 [2,12, 65,78]§	42,68 [5,95, 66,73]§	
SMM5-1 (%)	0,00 [0,00, 1,80]	0,06 [0,00, 0,94]	0,00 [0,00, 0,00]	0,00 [0,00, 0,00]	1,77 [0,00, 9,89]§	
CD172a (%)	36,62 [17,65, 84,45]	31,20 [4,72, 83,78]	52,03 [20,83, 74,62]	16,42 [10,37, 25,00]*§	13,90 [6,68, 76,13]§	
CD34 (%)	0,00 [0,00, 1,16]	1,69 [0,00, 7,04]	1,49 [0,00, 3,78]	1,09 [0,00, 5,28]	1,92 [0,52, 3,83]	
CD117 (%)	0,00 [0,00, 0,00]	0,93 [0,21, 6,46]†	0,37 [0,21, 2,54]°	0,86 [0,20, 2,53]*	1,44 [0,33, 7,52]	
ecNOS	1/6	3/6	0/5	5/6§	6/6§	

Figura 8

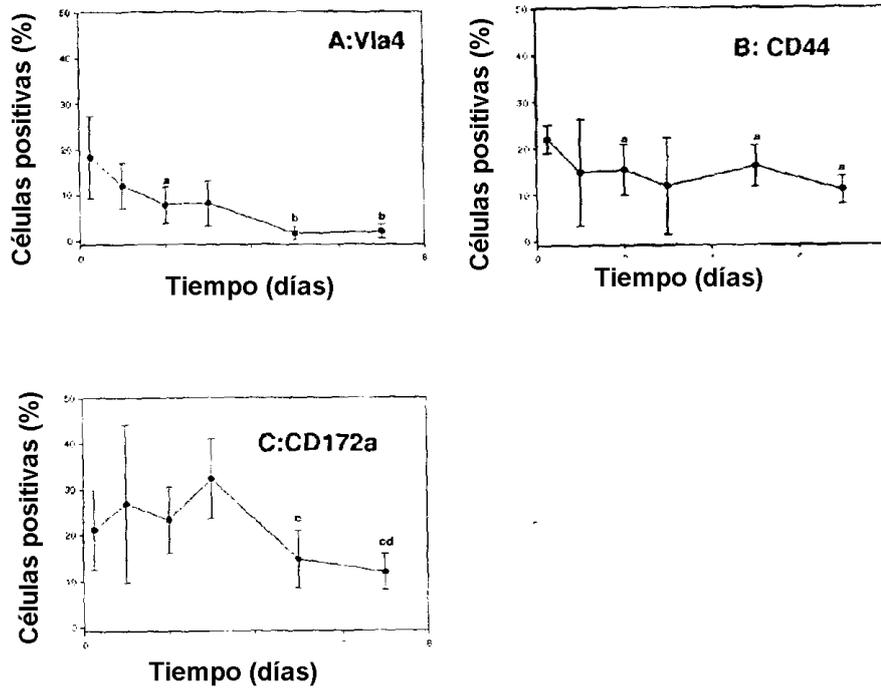


Figura 9

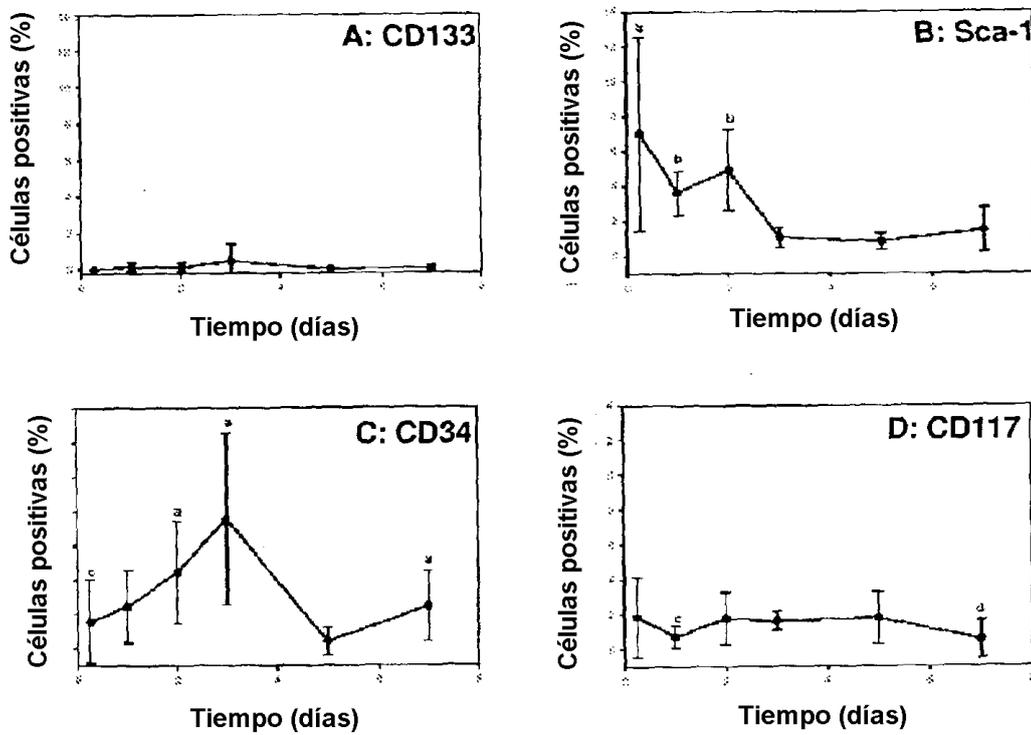


Figura 10

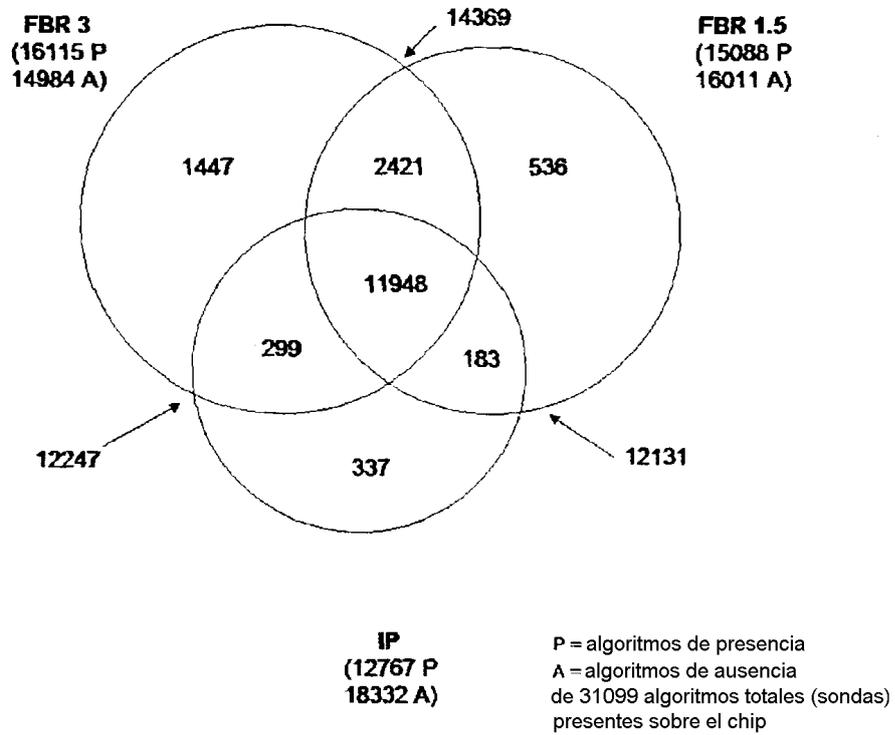


Figura 11

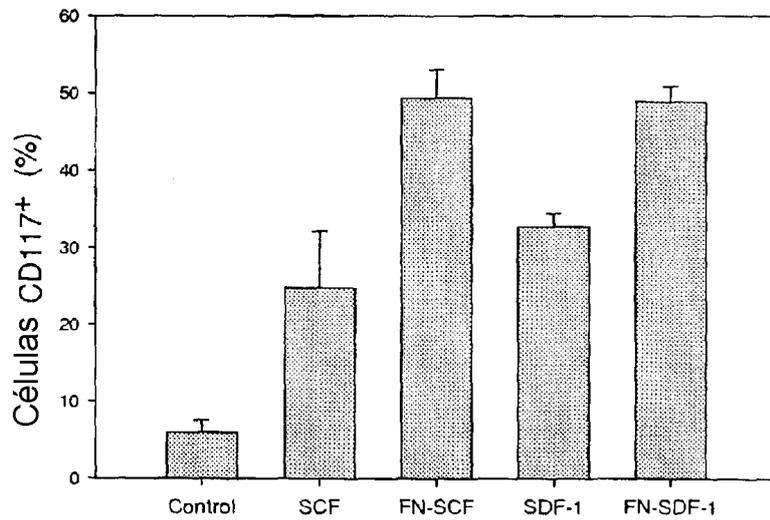


Figura 12A

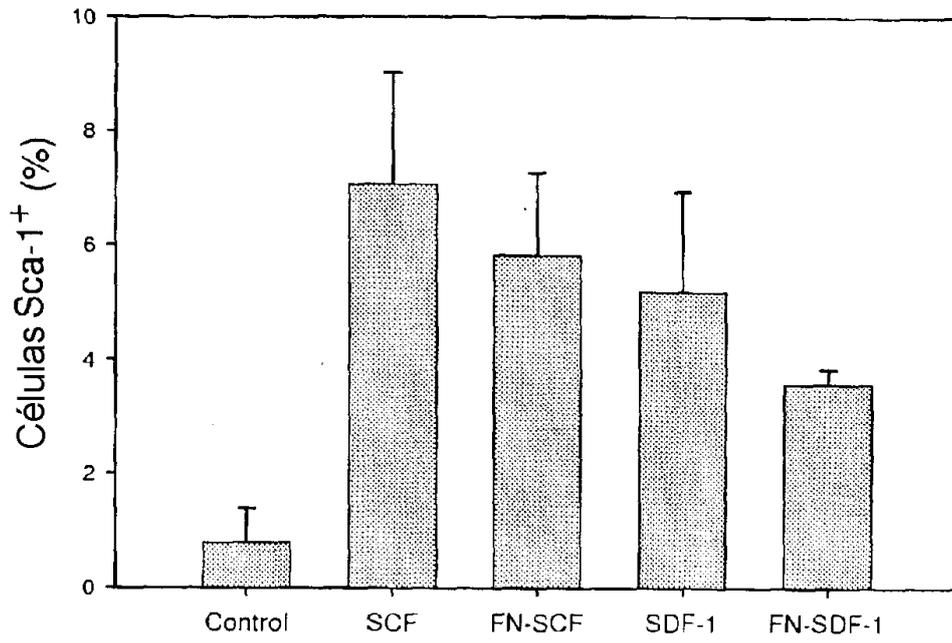


Figura 12B

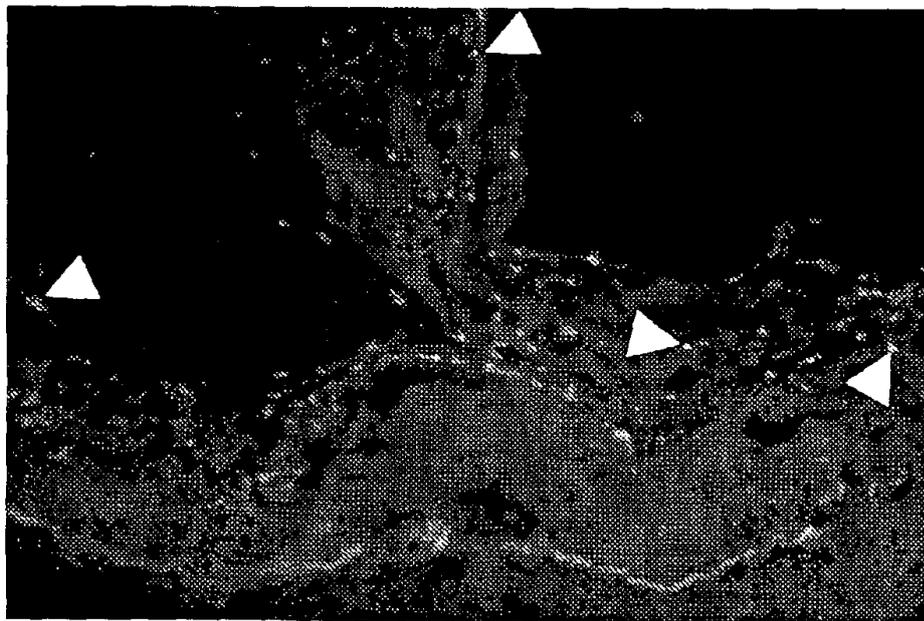


Figura 13