

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 449 890**

51 Int. Cl.:

A61L 27/36 (2006.01)

A61L 27/50 (2006.01)

A61L 31/00 (2006.01)

A61L 31/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.08.2010 E 10749559 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2014 EP 2473208**

54 Título: **Injertos vasculares obtenidos de matrices de tejido acelular**

30 Prioridad:

02.09.2009 US 239237 P

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

21.03.2014

73 Titular/es:

**LIFECCELL CORPORATION (100.0%)
One Millennium Way
Branchburg, NJ 08876, US**

72 Inventor/es:

**XU, HUI;
CUI, CUNQUI;
CZECZUGA, JOSHUA y
LOMBARDI, JARED**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 449 890 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Injertos vasculares obtenidos de matrices de tejido acelular

La presente divulgación se refiere a injertos vasculares y, más concretamente, a injertos vasculares obtenidos de matrices de tejido acelular.

- 5 Los recientes avances en el campo de la investigación cardiovascular y la bioingeniería han permitido desarrollar nuevas técnicas y materiales para la fabricación de conductos vasculares diseñados para la cirugía de derivación, reparación de vasos sanguíneos dañados o enfermos y otros procedimientos vasculares. Los injertos vasculares incluyen una amplia variedad de composiciones sintéticas y biológicas.

- 10 A pesar de los avances en la tecnología de los injertos, la reparación o sustitución de estructuras vasculares continúa representando un desafío, debido especialmente a las complicaciones derivadas del uso de injertos sintéticos, tales como la formación de fístulas entéricas, embolización distal, oclusión e infección de los injertos, durabilidad limitada y los malos resultados del injerto por lo que respecta a la anastomosis que exigen una nueva intervención. El problema de la aplicación de autoinjertos para la sustitución vascular es la limitación dimensional de los injertos obtenidos, la morbilidad en el lugar del que se extrae el injerto y los costes quirúrgicos asociados con la obtención de vasos autólogos. Adicionalmente, un número significativo de pacientes no dispone de venas adecuadas para practicar injertos, como consecuencia de una patología vascular, flebectomía o procedimientos vasculares previos.

US6918396 divulga un injerto de tejido de una submucosa o una membrana basal.

- 20 WO2005/023321 y US2007/004961 divulgan por separado una membrana basal utilizada únicamente como injerto vascular.

US6416995 divulga un injerto de tejido acelular del que se extirpa parcial o totalmente la membrana basal.

La presente divulgación proporciona métodos y materiales mejorados para la fabricación de injertos vasculares.

- 25 En un aspecto de la presente divulgación, se proporciona un injerto vascular para el tratamiento de un vaso sanguíneo enfermo o dañado. El injerto vascular comprende un conducto tubular que se compone de una pared tubular que es impermeable a la sangre y que delimita un lumen para el paso de la sangre a través del mismo. La pared tubular comprende una lámina de una matriz de tejido acelular que tiene una membrana basal. La membrana basal forma la superficie luminal del conducto tubular.

- 30 En otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método para fabricar un injerto vascular. El método comprende los pasos siguientes: proporcionar una lámina de una matriz de tejido acelular que tiene una membrana basal y conformar una lámina en un conducto tubular. La membrana basal forma la superficie luminal interior del conducto tubular.

Breve descripción de las ilustraciones

La FIG. 1A muestra un ejemplo de realización de un injerto vascular para el tratamiento de un vaso sanguíneo enfermo o dañado.

- 35 La FIG. 1B muestra una configuración alternativa del injerto vascular ilustrado en la FIG. 1;

La FIG. 2A muestra otro ejemplo de realización de un injerto vascular para el tratamiento de un vaso sanguíneo enfermo o dañado;

La FIG. 2B muestra otro ejemplo más de una realización de un injerto vascular para el tratamiento de un vaso sanguíneo enfermo o dañado;

- 40 La FIG. 3 ilustra un método para fabricar un injerto vascular de conformidad con determinadas realizaciones;

Las FIG. 4A-4H son imágenes de secciones histológicas de injertos vasculares explantados teñidas con hemotoxilina y eosina, tal como se describe en el Ejemplo 1;

Las FIG. 5A-5F son imágenes de secciones histológicas de injertos vasculares explantados teñidas con la tinción de Verhoeff Van Geison, tal como se describe en el Ejemplo 1;

- 45 Las FIG. 6A-6F son micrografías electrónicas de injertos vasculares explantados, tal como se describe en el Ejemplo 1;

Las FIG. 7A y 7B son micrografías electrónicas escaneadas de un injerto vascular explantado y una aorta de rata, tal como se describe en el Ejemplo 1;

Las FIG. 8A-8D son imágenes de secciones histológicas de transmisión de injertos vasculares explantados, teñidos con anticuerpos contra células endoteliales, tal como se describe en el Ejemplo 1;

- 5 Las FIG. 8E-8H son imágenes de secciones histológicas de injertos vasculares explantados, teñidos con anticuerpos contra Factor von Willebrand Factor, tal como se describe en el Ejemplo 1;

Las FIG. 9A-9E son imágenes de secciones histológicas de injertos vasculares explantados, teñidos con anticuerpos contra células de músculo liso, tal como se describe en el Ejemplo 1;

- 10 Las FIG. 9F-9J son imágenes de secciones histológicas de injertos vasculares explantados, teñidos con anticuerpos contra fibroblastos, tal como se describe en el Ejemplo 1;

Las FIG. 10A-10L son imágenes de secciones histológicas de injertos vasculares explantados, teñidos con anticuerpos contra linfocitos T, linfocitos B y macrófagos de rata, tal como se describe en el Ejemplo 1;

Las FIG. 11A-11E son imágenes de secciones histológicas de injertos vasculares explantados, teñidos con anticuerpos contra IgG de rata, tal como se describe en el Ejemplo 1;

- 15 Las FIG. 11F-11G son imágenes de secciones histológicas de injertos vasculares explantados, teñidos con anticuerpos contra IgM de rata, tal como se describe en el Ejemplo 1;

La FIG. 12 muestra los resultados de termoestabilidad de matrices dérmicas acelulares pegadas, tal como se describe en el Ejemplo 2; y

- 20 La FIG. 13 ilustra el efecto de las colas biológicas sobre la propiedad antitrombótica de la heparina como revestimiento de matrices dérmicas acelulares, tal como se describe en el Ejemplo 2.

Descripción de ejemplos de realizaciones

A continuación se hace referencia de forma detallada a determinadas realizaciones coherentes con la presente divulgación, cuyos ejemplos se representan en las ilustraciones adjuntas. Siempre que resulte posible, se utilizarán los mismos números de referencia en todas las ilustraciones para referirse a partes iguales o similares.

- 25 En la presente solicitud, el uso del singular incluye el plural, a menos que se indique específicamente lo contrario. En la presente solicitud, el uso de "o" significa "y/o", a menos que se indique lo contrario. Asimismo, el uso del término "incluyendo", así como de otras formas tales como "incluye" e "incluido", no tiene un carácter limitador. Por otra parte, términos como "elemento" o "componente" incluyen tanto los elementos y componentes que comprenden una unidad como los elementos y componentes que incluyen más de una subunidad, a menos que se indique específicamente lo contrario. Asimismo, el uso del término "parte" puede incluir parte de una fracción o la fracción completa.
- 30

- El término "matriz de tejido acelular", para los fines del presente, se refiere en general a cualquier matriz de tejido que esté sustancialmente libre de células y otro material antigénico. En diversas realizaciones, se pueden utilizar matrices de tejido acelular de origen humano o xenogénico para producir los soportes. La piel, partes de piel (p. ej., dermis) y otros tejidos como vasos sanguíneos, válvulas cardíacas, fascias y tejido conectivo nervioso se pueden utilizar para crear matrices acelulares, con el objeto de producir soportes de tejido dentro del ámbito de aplicación de la presente divulgación.
- 35

- Los títulos de las secciones empleados en el presente tienen fines exclusivamente organizativos y no se interpretará que tienen carácter limitador con respecto al objeto descrito. Todos los documentos, o partes de documentos, citados en la presente solicitud, incluyendo, a título meramente enunciativo, solicitudes de patentes, artículos, libros y tratados, se incorporan expresamente como referencia en su totalidad para cualquier fin.
- 40

- En diversas realizaciones, se proporcionan materiales y métodos para la fabricación de injertos arteriales o venosos para el tratamiento de defectos de los vasos sanguíneos. En diversas realizaciones, los injertos vasculares se emplean para la sustitución de una parte de un vaso sanguíneo enfermo o dañado, por ejemplo, sustitución de una parte debilitada de la aorta, tratamiento de vasos dañados debido a un traumatismo, tratamiento de enfermedades vasculares causadas por condiciones médicas (como diabetes, enfermedad autoinmune, etc.). En determinadas realizaciones, los injertos vasculares se utilizan derivando y/o sustituyendo segmentos parcialmente ocluidos o estenóticos de un vaso sanguíneo, por ejemplo, injertos de derivación coronaria o de arterias periféricas.
- 45

- En diversas realizaciones, un injerto vascular comprende una lámina de material al que se le ha dado la forma de conducto tubular. La pared tubular del injerto es impermeable a la sangre bajo las presiones hemodinámicas que experimentan los vasos sanguíneos naturales. En diversas realizaciones, la lámina de material que forma el injerto tubular tiene suficiente solidez y durabilidad como para ser empleada en aplicaciones vasculares, y las propiedades
- 50

mecánicas (como la elasticidad) son similares a las del vaso adyacente del huésped. En determinadas realizaciones, el recubrimiento luminal del injerto es antitrombótico. En algunas realizaciones, la lámina de material que forma el injerto soporta la remodelación y repoblación del tejido del injerto con las células del huésped. En determinadas realizaciones, el material que forma el injerto soporta la deposición de células endoteliales sobre la superficie luminal y la integración de células de músculo liso en la pared luminal del injerto.

Una membrana basal es una lámina fina de material extracelular contiguo con el aspecto basilar de las células epiteliales. Las láminas de células epiteliales agregadas forman un epitelio. Así, por ejemplo, el epitelio de la piel se denomina epidermis y la membrana basal de la piel se encuentra entre la epidermis y la dermis.

La membrana basal es una matriz extracelular especializada que proporciona una función de barrera y una superficie de sujeción para las células pseudoepiteliales; sin embargo, no aporta ningún papel estructural o biomecánico significativo al tejido subyacente (por ejemplo, la dermis). Los componentes de las membranas basales incluyen, por ejemplo, laminina, colágeno tipo VII y nidógeno. La organización temporal y espacial de la membrana basal epitelial la distingue, por ejemplo, de la matriz extracelular dérmica.

La lámina de material incluye una matriz de tejido acelular. En diversas realizaciones, la matriz de tejido acelular comprende una membrana basal intacta. La membrana basal forma la superficie luminal del conducto vascular. La membrana basal proporciona una superficie luminal continua y no porosa al injerto y, por tanto, evita la fuga de sangre del lumen del injerto. Por otra parte, la membrana basal puede soportar el crecimiento de células endoteliales y prevenir la trombosis. Por tanto, la membrana basal puede permitir la formación de un revestimiento endotelial que impide la fuga y/o trombosis, pero que no necesita ser sembrado o cultivado con células exógenas.

La matriz de tejido acelular se puede formar con diversos tejidos diferentes, entre los que se incluye una membrana basal. Por ejemplo, la matriz de tejido acelular se puede fabricar con tejido cutáneo, de la vejiga, intestino, pericárdico, peritoneal o combinaciones de tejidos. Un biomaterial adecuado para formar la matriz acelular se obtiene de la piel humana, como ALLODERM®, comercializado por (LifeCell Corp, Branchburg, NJ). ALLODERM® es una matriz dérmica acelular humana que ha sido procesada para eliminar tanto la epidermis como las células que pueden provocar un rechazo del tejido o un fracaso del injerto, sin dañar las proteínas dérmicas ni la membrana basal. En otro ejemplo de realización, la matriz de tejido acelular comprende una matriz pericárdica generada mediante el procesamiento del tejido pericárdico, manteniendo al mismo tiempo la integridad de la membrana basal. En otra realización más, la matriz de tejido acelular se obtiene de la membrana peritoneal, que es procesada para eliminar las células, al tiempo que se mantiene intacta la membrana basal. La producción de matrices de tejido acelular adecuadas se describe detalladamente más adelante.

En diversas realizaciones, la superficie luminal del injerto se modifica utilizando agentes antitrombóticos o anticalcificantes para inhibir la oclusión del injerto después de la cirugía. En otras realizaciones, la superficie luminal del injerto vascular se trata con factores de crecimiento que potencian la proliferación de células endoteliales a lo largo de la superficie luminal.

Conformar una lámina de matriz de tejido acelular en un conducto, se pueden unir los bordes opuestos de la lámina. En diversas realizaciones, los bordes se unen entre sí utilizando suturas, un adhesivo biológicamente compatible o una combinación de ambos, con el fin de formar una costura impermeable que se extiende longitudinalmente a lo largo del injerto. En algunas realizaciones, los bordes de la lámina enrollada se unen utilizando un tratamiento de calor y presión. Entre las suturas adecuadas se incluyen, por ejemplo, las suturas de polipropileno (PROLENE®), y pueden ser continuas o interrumpidas. Entre los adhesivos adecuados se incluyen, por ejemplo, la cola de fibrina, adhesivos para tejidos a base de cianoacrilato (como DERMABOND®) y los adhesivos para tejidos de quitosán. En algunas realizaciones, los bordes de la lámina se entrecruzan (por ejemplo, utilizando reticulación inducida por radiación o química) entre sí o con una capa subyacente de material, para garantizar que los bordes no se suelten una vez que la lámina se haya enrollado en una estructura tubular.

La FIG. 1A muestra un ejemplo de realización de un injerto vascular 10, de conformidad con la presente divulgación. El injerto 10 comprende una lámina de material 12, que está enrollada para formar una estructura tubular que delimita un lumen 13, y una pared tubular 15 que tiene una superficie luminal 17 y una superficie abluminal 19. Los bordes longitudinales 14 y 16 de la lámina se ponen en contacto entre sí por la cara abluminal de la estructura tubular y se unen utilizando suturas quirúrgicas y/o bioadhesivos a lo largo del injerto. La unión de los bordes longitudinales 14 y 16 crea una cresta longitudinal 18 que sobresale sobre la superficie abluminal 19 y se extiende a lo largo del injerto tubular. En una realización, la cresta longitudinal 18 está plegada y unida a la superficie abluminal 19 del injerto 10, tal como se muestra en la

FIG. 1B. La cresta longitudinal 18 está fijada a la pared tubular 15 a lo largo del injerto, utilizando suturas, adhesivos, o una combinación de ambos.

La FIG. 2A muestra un ejemplo de realización de un injerto vascular 20, de conformidad con la presente divulgación. El injerto 20 comprende una lámina de material 22 que está enrollada formando una estructura tubular que delimita un lumen 23. La lámina de material 22 forma una pared tubular 21 que tiene una superficie luminal 27 y una superficie abluminal 29. La lámina 22 comprende un primer borde longitudinal 24 y un segundo borde longitudinal 26 en los extremos opuestos de la lámina 22. Cuando la lámina 22 se enrolla formando un conducto, el segundo borde longitudinal 26 se extiende sobre el primer borde 24 para definir una región solapada 25 de múltiples capas que se extiende entre el primer borde 24 y el segundo borde 26. La región solapada 25 se sella a lo largo del injerto utilizando suturas y/o adhesivos. En determinadas realizaciones, el rango de solapamiento es al menos el 10% del ancho de una lámina de material individual.

Se pueden formar injertos vasculares adecuados utilizando diversas técnicas. Por lo general, los injertos se producirán en base a unos requisitos de tamaño, longitud y biomecánicos deseados, necesarios para una ubicación de implantación seleccionada. Por ejemplo, por lo general un injerto diseñado para ser utilizado como un injerto vascular aórtico tendrá un tamaño y unas propiedades biomecánicas (por ejemplo, resistencia a la rotura) superiores a los diseñados para otra ubicación que pueda estar sujeta a presiones inferiores y transportar un flujo de sangre menor.

En diversas realizaciones, el grosor de la lámina de material es coherente con el grosor de la pared de un vaso sanguíneo que va a ser sustituido por el injerto vascular. En diversas realizaciones, la lámina de material tiene un tamaño que se corresponde con el grosor de la pared de un vaso sanguíneo natural.

En diversas realizaciones, se pueden formar injertos enrollando una lámina de material conforme a un tamaño predeterminado (es decir, el diámetro luminal). En algunas realizaciones, tal como se ilustra en la Fig. 2, se puede formar un injerto vascular enrollando una lámina de biomaterial 32 alrededor de la superficie exterior de una barra cilíndrica o un tubo 30. Una sección longitudinal 34 de la lámina se enrolla alrededor de una barra cilíndrica 30. En una realización, se coloca una barra de presión 35 paralela a la barra cilíndrica 30, tal como se muestra en la FIG. 3, para presionar la sección 34 contra la barra cilíndrica. También se puede utilizar una sutura mantenida en tensión entre dos soportes para presionar la sección 34 contra la barra cilíndrica. A continuación se gira la barra al menos 360° sobre un eje longitudinal 31 de la barra, para enrollar la lámina de material alrededor de la superficie exterior de la barra. En una realización, la lámina 32 se enrolla alrededor de la barra varias veces para formar un injerto de múltiples capas. Una vez que la lámina se ha enrollado alrededor de la barra cilíndrica, el borde exterior 36 de la lámina se fija a una capa subyacente de la lámina, tal como se ilustra en la FIG. 2.

En una realización, se unen tiras adhesivas 38 a la lámina 32 en múltiples puntos a lo ancho de la lámina, tal como se muestra en la FIG. 3. En esta realización, las cintas adhesivas 38 se unen a la lámina 32 en una capa subyacente de material cuando la lámina se enrolla alrededor de la barra cilíndrica 30.

El diámetro interior del injerto tubular es sustancialmente igual al diámetro exterior de la barra cilíndrica o el tubo 30. Por tanto, el diámetro de la barra o el tubo se seleccionará en función del diámetro luminal del vaso sanguíneo natural que se pretende sustituir por la estructura del injerto. En una realización, el diámetro de la barra es aproximadamente de unos 4-5 mm, que se utiliza para fabricar injertos vasculares de pequeño diámetro (< 6 mm). En otra realización, el grosor de la pared del tubo de es 1 mm. Después de enrollar la lámina alrededor de la barra y de unir el borde o los bordes longitudinales de la lámina, se extrae la barra de la lámina enrollada. En otra realización, se tira del tubo longitudinalmente para deslizar la lámina fuera del tubo. El material de la barra cilíndrica se seleccionará para evitar que la lámina se adhiera a la superficie exterior de la barra. En otro ejemplo de realización, la barra cilíndrica utilizada es una barra de vidrio. En otra realización, el tubo cilíndrico utilizado es un tubo de goma. En otra realización más, el tubo utilizado es un tubo de silicona.

Matrices de tejido acelular adecuadas

En algunas realizaciones, las matrices de tejido acelular adecuadas pueden, por ejemplo, conservar determinadas funciones biológicas, tales como el reconocimiento celular, la unión celular, la capacidad para propagar las células, la proliferación celular, el crecimiento celular y la diferenciación celular. Estas funciones las pueden proporcionar, por ejemplo, proteínas de colágeno no desnaturalizadas (como colágeno tipo I) y diversas moléculas no colagenosas (como las proteínas que actúan como ligandos para moléculas como receptores de integrinas, moléculas con alta densidad de carga como glucosaminoglucanos (como hialuronano) o proteoglicanos u otras adhesinas). En algunas realizaciones, las matrices de tejido acelular pueden conservar determinadas funciones estructurales, incluyendo el mantenimiento de la arquitectura histológica y el mantenimiento de la disposición tridimensional de los componentes del tejido. Las matrices de tejido acelular descritas en el presente también pueden, por ejemplo, presentar características físicas deseables, tales como solidez, elasticidad y durabilidad, una porosidad definida y retención de macromoléculas. Las matrices de tejido acelular adecuadas pueden estar entrelazadas o desentrelazadas.

En algunas realizaciones, el material del injerto puede ser remodelado mediante la infiltración de células, tales como células diferenciadas del tejido correspondiente del huésped, células madre como células madre mesenquimales, o células progenitoras. Esto se puede conseguir, por ejemplo, formando el material de la matriz del injerto a partir de tejido que es idéntico al tejido circundante del huésped, aunque esta identidad no es necesaria.

La remodelación puede estar dirigida por los componentes de la matriz de tejido acelular anteriormente descritos y por señales del tejido circundante del huésped (tales como citoquinas, componentes extracelulares de la matriz, estímulos biomecánicos y estímulos bioeléctricos). Por ejemplo, la presencia de células madre mesenquimales en la médula ósea y la circulación periférica ha sido documentada en la bibliografía y se ha demostrado que regeneran diversos tejidos musculoesqueléticos [Caplan (1991) J. Orthop. Res. 9:641-650; Caplan (1994) Clin. Plast. Surg. 21:429-435; y Caplan et al. (1997) Clin Orthop. 342:254-269]. Por otra parte, el injerto podría proporcionar cierto grado (superior al umbral) de resistencia a la tracción y fuerza biomecánica durante el proceso de remodelación.

Se pueden fabricar matrices de tejido acelular a partir de diversos tejidos fuente. Por ejemplo, se puede producir una matriz de tejido acelular a partir de cualquier tejido blando que contenga colágeno y esqueleto muscular (por ejemplo, dermis, fascia, pericardio, duramadre, cordones umbilicales, placentas, válvulas cardíacas, ligamentos, tendones, tejido vascular (arterias y venas, como las venas safenas), tejido conectivo neural, tejido de la vejiga urinaria, tejido de los uréteres o tejido intestinal), siempre que la matriz conserve las propiedades anteriormente descritas [0050]. A pesar de que una matriz de tejido acelular puede estar fabricada a partir de uno o más individuos de la misma especie que el receptor del injerto de la matriz del tejido acelular, esto no es necesario. Así, por ejemplo, una matriz de tejido acelular puede estar fabricada con tejido porcino y ser implantada en un paciente humano. Las especies que pueden servir como receptores de la matriz de tejido acelular y donantes de tejidos u órganos para la producción de la matriz de tejido acelular incluyen, a título meramente enunciativo, seres humanos, primates no humanos (como monos, babuinos o chimpancés), cerdos, vacas, caballos, cabras, ovejas, perros, gatos, conejos, cobayas, jerbos, hamsters, ratas o ratones. Resultan de particular interés como donantes los animales (por ejemplo, cerdos) que han sido modificados genéticamente para que carezcan de la fracción terminal alfa-galactosa. Para ver descripciones de los animales adecuados, véase la Solicitud copendiente estadounidense de la serie n.º 10/896.594 y la Patente estadounidense n.º 6.166.288.

En algunas realizaciones, se produce una matriz de tejido acelular desecado por congelación a partir de dermis humana por parte de LifeCell Corporation (Branchburg, NJ), comercializada en forma de pequeñas láminas como ALLODERM®. El crioprotector utilizado para congelar y desecar ALLODERM® es una solución de maltodextrina al 35% y 10mM etilendiaminetetracetato (EDTA). De este modo, el producto seco final contiene aproximadamente un 60% en peso de matriz de tejido acelular y un 40% en peso de maltodextrina. LifeCell Corporation también fabrica un producto análogo a partir de dermis porcina (denominado XENODERM), que tiene las mismas proporciones de matriz de tejido acelular y maltodextrina que ALLODERM®.

Como alternativa al uso de estos animales genéticamente modificados como donantes, se pueden tratar los tejidos y órganos apropiados, antes o después de la descelularización, con la enzima alfa-galactosidasa, que elimina las fracciones terminales de alfa-galactosa (alfa-gal) de las cadenas de sacáridos de, por ejemplo, las glucoproteínas. Los métodos para tratar el tejido con alfa-galactosidasa para eliminar estas fracciones se describen, por ejemplo, en la Patente estadounidense n.º 6.331.319.

En una implementación, antes o después de destruir las células de la matriz de tejido acelular, el material que contiene colágeno se somete a digestión *in vitro* del material que contiene colágeno con una o más glucosidasas, y particularmente galactosidasas, como la alfa-galactosidasa. En particular, los epítomos de alfa-gal son eliminados mediante tratamiento enzimático con alfa-galactosidasas.

Los residuos de N-acetilactosamina son epítomos que normalmente se expresan en las células humanas y de mamíferos y que, por tanto, no son inmunogénicas. La digestión *in vitro* del material que contiene colágeno con glucosidasas se puede realizar por diversos métodos. Por ejemplo, el material que contenga colágeno se puede empapar o incubar en una solución tampón que contiene glucosidasa. Alternativamente, se puede introducir bajo presión una solución tampón que contenga glucosidasa en el material que contiene colágeno a través de un proceso de lavado pulsátil.

La eliminación de los epítomos de alfa-gal del material que contiene colágeno puede disminuir la respuesta inmune frente al material que contiene colágeno. El epítomo de alfa-gal se expresa en mamíferos no primates y en monos del Nuevo Mundo (monos de Sudamérica), así como en macromoléculas como los proteoglicanos de los componentes extracelulares. U. Galili et al., J. Biol. Chem. 263: 17755 (1988). Sin embargo, este epítomo no se encuentra presente en los primates del Viejo Mundo (monos de Asia y África y simios) ni en los seres humanos. *Id.* Los anticuerpos anti-gal se producen en los seres humanos y primates como resultado de una respuesta inmune a las estructuras de carbohidratos de un epítomo de alfa-gal de las bacterias gastrointestinales. U. Galili et al., Infect. Immun. 56: 1730 (1988); R. M. Hamadeh et al., J. Clin. Invest. 89: 1223 (1992).

Dado que los mamíferos no primates (como los cerdos) producen epítomos de alfa-gal, el xenotrasplante por inyección de material que contiene colágeno de estos mamíferos en los primates suele producir un rechazo, debido a la unión de anti-gal de primate a estos epítomos en el material que contiene colágeno. La unión produce la destrucción del material que contiene colágeno por fijación del complemento y por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. U. Galili et al., Immunology Today 14: 480 (1993); M. Sandrin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 11391 (1993); H. Good et al., Transplant. Proc. 24: 559 (1992); B. H. Collins et al., J. Immunol. 154: 5500 (1995). Por otra parte, el xenotrasplante provoca una importante activación del sistema inmunitario para producir una mayor

cantidad de anticuerpos anti-gal de elevada afinidad. Por consiguiente, la eliminación sustancial de epítomos de alfa-gal de las células y de los componentes extracelulares del material que contiene colágeno, así como la prevención de la reexpresión de epítomos de alfa-gal celulares, pueden reducir la respuesta inmune frente al material que contiene colágeno asociada a la unión de anticuerpo anti-gal a epítomos de alfa-gal.

5 La matriz de tejido acelular adecuada para ser utilizada en la presente divulgación se puede producir mediante diversos métodos, siempre que su producción tenga como resultado matrices con las propiedades estructurales y biológicas anteriormente descritas. Por lo general, los pasos que implican la producción de una matriz de tejido acelular incluyen la recogida del tejido de un donante (por ejemplo, un cadáver humano o cualquiera de los mamíferos mencionados), el tratamiento químico para estabilizar el tejido y evitar la degradación bioquímica y estructural, junto con (o seguida de) la eliminación de las células en unas condiciones que preserven una función estructural y biológica de forma similar. La solución estabilizadora inicialmente tiene y evita la degradación osmótica, hipóxica, autolítica y proteolítica, protege frente a la contaminación microbiana y reduce el daño mecánico que puede producirse con tejidos que contienen, por ejemplo, componentes de músculo liso (como vasos sanguíneos). La solución estabilizadora puede contener un tampón apropiado, uno o más antioxidantes, uno o más agentes oncóticos, uno o más antibióticos, uno o más inhibidores de la proteasa y, en algunos casos, un relajante de músculo liso. En algunos ejemplos de realizaciones, el tejido recogido (por ejemplo, tejido dérmico) es tratado con una solución química de desepitelización para eliminar el epitelio de la muestra de tejido. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una muestra que contiene tejido dérmico humano o porcino se sumerge durante una noche en una solución de 1M NaCl a temperatura ambiente para eliminar la capa epitelial. En determinadas realizaciones, la concentración de la solución se incrementa hasta 1,5 M para garantizar la eliminación de la capa epitelial por completo.

A continuación, se coloca el tejido en una solución de descelularización para eliminar las células viables (por ejemplo, células epiteliales, células endoteliales, células de músculo liso y fibroblastos) de la matriz estructural sin dañar el complejo de la membrana basal ni la integridad biológica y estructural de la matriz de colágeno. La solución de descelularización puede contener un tampón adecuado, sal, un antibiótico, uno o más detergentes (por ejemplo, TRITON X-100™, desoxicolato de sodio, monooleato de polioxietileno (20) sorbitán), uno o más agentes para prevenir el entrelazado, uno o más inhibidores de la proteasa y/o una o más enzimas. En algunas realizaciones, la solución de descelularización comprende TRITON X-100™ al 1% en medio RPMI con gentamicina y 25 mM EDTA (ácido etilendiaminotetraacético). En algunas realizaciones, el tejido se incuba en la solución de descelularización durante una noche a 37°C, con agitación suave a 90 rpm. En determinadas realizaciones, se pueden utilizar detergentes adicionales para eliminar la grasa de la muestra de tejido. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se añade desoxicolato de sodio al 2% a la solución de descelularización para el tratamiento de las membranas peritoneales.

Después del proceso de descelularización, se lava a fondo la muestra de tejido con solución salina. En algunos ejemplos de realización, por ejemplo cuando se utiliza material xenogénico, el tejido descelularizado se trata a continuación durante una noche, a temperatura ambiente, con una solución de desoxirribonucleasa (DNasa). En algunas realizaciones, la muestra de tejido (por ejemplo, tejido peritoneal o pericárdico) es tratada con una solución de DNasa preparada en tampón de DNasa (20 mM HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico), 20 mM CaCl₂ y 20 mM MgCl₂). Opcionalmente, se puede añadir una solución antibiótica (por ejemplo, gentamicina) a la solución de DNasa.

Después de lavar el tejido a fondo con solución salina para eliminar la solución de DNasa, la muestra de tejido se puede someter a uno o más tratamientos enzimáticos para eliminar cualquier antígeno inmunogénico presente en la muestra. Como se ha señalado anteriormente, la muestra de tejido puede ser tratada con una enzima alfa-galactosidasa para eliminar los epítomos de alfa-gal presentes en el tejido. En algunas realizaciones, la muestra de tejido es tratada con alfa-galactosidasa a una concentración de 300 U/L preparada en 100 mM solución tampón de fosfato de pH 6.0. En otras realizaciones, la concentración de alfa-galactosidasa se incrementa hasta 400 U/L para una eliminación adecuada de los epítomos de alfa-gal del tejido recogido (por ejemplo, en el tratamiento de tejidos dérmicos de origen porcino).

Tras haber eliminado a fondo los componentes celulares muertos y/o lisados, y los antígenos que pueden causar inflamación, así como cualquier agente biocompatible para la eliminación de células, se puede tratar la matriz con un agente de criopreservación y criopreservarse y, opcionalmente, desecarse por congelación, una vez más en las condiciones necesarias para mantener las propiedades biológicas y estructurales descritas de la matriz. Tras la criopreservación o el desecado por congelación, la matriz de tejido acelular puede ser descongelada o rehidratada, respectivamente. Por lo general, todos los pasos se realizan en condiciones asépticas, preferiblemente estériles.

Opcionalmente, una vez que se ha formado la matriz de tejido acelular, se pueden sembrar células viables histocompatibles en la matriz de tejido acelular para producir un injerto que pueda ser posteriormente remodelado por el huésped. En una realización, se pueden añadir células viables histocompatibles a las matrices mediante técnicas estándar de cocultivo celular *in vitro* antes del trasplante o mediante la repoblación *in vivo* tras el trasplante. La repoblación *in vivo* puede ser por la migración de las propias células del receptor a la matriz de tejido acelular o mediante la infusión o inyección de células obtenidas del receptor o células histocompatibles de otro donante en la matriz de tejido acelular *in situ*.

Los tipos de células seleccionados para la reconstitución pueden depender de la naturaleza del tejido u órgano en el que se va a remodelar la matriz de tejido acelular. Por ejemplo, la célula endotelial es importante para la reconstitución de conductos vasculares. Estas células recubren la pared interior del tejido y se pueden expandir en cultivo. Las células endoteliales se pueden obtener directamente del paciente receptor previsto o de venas o arterias umbilicales, y se pueden emplear para reconstituir una matriz de tejido acelular, para injertar la composición resultante al receptor. Alternativamente, se pueden añadir células cultivadas (autólogas o alogénicas) a la matriz de tejido acelular. Estas células se pueden producir, por ejemplo, en las condiciones estándar de un cultivo de tejidos y posteriormente añadirse a la matriz de tejido acelular. En otra realización, las células se pueden producir en cultivo de tejido en una matriz de tejido acelular y/o sobre la misma. Estas células producidas en cultivo de tejido en una matriz de tejido acelular y/o sobre la misma se pueden obtener directamente de un donante apropiado (por ejemplo, el receptor previsto o un donante alogénico) o se pueden producir primero en cultivo de tejido en ausencia de la matriz de tejido acelular.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para explicar mejor las diversas realizaciones y no se deberá interpretar en ningún caso que limitan el alcance de la presente divulgación.

15 **Ejemplo 1. Estudio funcional de injertos vasculares obtenidos de matrices dérmicas**

Los injertos vasculares se formaron utilizando ALLODERM®, que es una matriz dérmica acelular humana (HADM) comercializada por LifeCell Corporation (Branchburg, NJ). La HADM se proporcionó en láminas con un grosor de 0,3-0,5 mm. La HADM se sumergió en solución salina durante 30 minutos y, a continuación, se cortó en una sección de 0,5 x 1,5 cm. HADM ALLODERM® incluye una membrana basal intacta y las secciones de la HADM se enrollaron para formar conductos con la membrana basal a lo largo de la superficie luminal de los mismos. Los conductos se suturaron a lo largo del borde de unión, a fin de crear una estructura tubular de una sola capa.

Los injertos vasculares se ensayaron a continuación en la sustitución de la aorta abdominal en un modelo de rata. Se anestesiaron 20 ratas macho Lewis adultas (9-11 semanas de edad) con 40 mg/kg de pentobarbital intraperitoneal y se realizó una incisión abdominal en la línea media en cada rata. Se extirpó un segmento de un centímetro de la aorta abdominal, desde debajo de las arterias renales hasta el punto que se encuentra justo por encima de la bifurcación aórtica, a través de la incisión de la línea media. El segmento arterial extirpado se sustituyó por un injerto vascular obtenido de una HADM. Los injertos se implantaron en posición ortotópica, con anastomosis de extremo a extremo, utilizando suturas interrumpidas de nylon 9-0. La calidad del injerto y el grado de cicatrización del punto de implantación se documentó en cuatro puntos de valoración del estudio (1, 3, 6 y 12 meses). Se sacrificaron cinco animales en cada punto de valoración. Se extirpó un centímetro del injerto vascular y 0,5 cm de material del tejido del huésped más allá de la anastomosis (longitud total de explante de 2 cm) a cada animal sacrificado y se tomó una muestra del bazo y del nódulo linfático. Las secciones explantadas se utilizaron para análisis histológicos, inmunoquímicos, SEM (Microscopía electrónica de barrido) y TEM (Microscopía electrónica de transmisión). Las muestras extirpadas, que representan la unión de la porción media del injerto y el tejido del huésped injertado, se colocaron en formalina al 10% o glutaraldehído al 8% (para el análisis SEM y TEM), para su fijación y posterior análisis.

Observación clínica

Todos los animales que recibieron el injerto vascular presentaron una recuperación posquirúrgica normal y mantuvieron su peso o lo aumentaron durante el periodo del estudio, de forma similar a los animales no operados. Catorce animales sobrevivieron hasta su fecha de sacrificio predeterminada sin ningún síntoma clínico de fracaso del implante, evidenciado por un movimiento limitado de las patas o cambios patológicos en las mismas. Un animal falleció cuatro días después del implante debido a una hemorragia interna. No se produjo ningún síntoma de infección en el punto de la cirugía en ningún animal durante el estudio. La observación general de los injertos vasculares explantados no mostró evidencia de estenosis, aneurisma, hiperplasia, dehiscencia de la sutura ni formación de trombos. Por otra parte, la mayoría de los injertos explantados presentaban unas superficies lumbales lisas, sin que se observase ninguna evidencia de calcificación. Dos de los injertos (explantados a los 6 y a los 12 meses) mostraban zonas más rígidas que la estructura vascular normal, lo que sugiere una calcificación vascular. Todos los injertos se integraron bien en la aorta natural de la rata en el punto de la anastomosis.

Histología

Las secciones de injerto explantadas se procesaron con H&E (hematoxilina y eosina) y tinción de Verhoeff Geison. La tinción con H&E de una sección transversal representativa del injerto a los tres meses (FIG. 4A y 4B) y a los 12 meses (FIG. 4C-4G) demostró la presencia de fibroblastos que poblaban los injertos y algunas células endoteliales recubriendo la superficie luminal de los injertos. Las FIG. 4A-4E son secciones transversales teñidas con H&E, tomadas de la parte media de los injertos, las FIG. 4F y 4G son secciones transversales teñidas con H&E, tomadas en el punto de la anastomosis; y la FIG. 4H es la tinción con H&E de un injerto que nunca fue implantado y que se utilizó como control en el estudio.

La histología del sitio de la anastomosis explantado mostró una integración del tejido total y una transición homogénea del injerto al vaso sanguíneo del huésped. Se observó una ligera infiltración de células inflamatorias al

cabo de un mes, pero el nivel se redujo con el paso del tiempo y no se observaron células inflamatorias a los tres meses, lo que indica que los injertos implantados no produjeron inflamación crónica.

Las FIG. 5A y 5B muestran la tinción de Verhoffs de secciones transversales, tomadas de la parte media de los injertos; las FIG. 5C y 5D muestran la tinción de Verhoffs de secciones transversales tomadas en el punto de la anastomosis; la FIG. 5E muestra la tinción de Verhoffs de una aorta de rata normal y la FIG. 5F muestra un injerto vascular antes del implante, utilizado como control. La tinción de Verhoffs de las secciones transversales del injerto indicó que los neomedios eran ricos en colágeno y las células parecían presentar una amplia deposición de elastina.

Análisis por SEM y TEM

Las FIG. 6A-6F son micrografías SEM de injertos vasculares producidos tal y como se ha descrito anteriormente. La SEM de injertos antes del implante no mostró ninguna estructura celular sobre la superficie de la membrana basal, tal como se muestra en la FIG. 6A. Los injertos vasculares explantados al cabo de un mes presentaban células endoteliales en sus superficies lumbales (FIG. 6B); a los tres meses, las células de tipo endotelial cubrían por completo la superficie luminal (FIG. 6C). La unión del injerto y la aorta de rata mostró anastomosis intacta, tal como se muestra en la FIG. 6D. La superficie del injerto a los tres meses (FIG. 6E) estaba completamente cubierta de células y no se distinguía de la superficie de la aorta de rata (FIG. 6F).

De forma similar, las micrografías TEM de injertos vasculares representativos tomados al cabo de un mes (FIG. 7A) mostraban células endoteliales planas con la membrana basal (BM) correspondiente recubriendo el lumen del injerto. En las imágenes TEM también se observaron claramente células de músculo liso (SMC) con microfilamentos y cuerpos densos. El material de tinción oscuro a lo largo de la superficie de las células de músculo liso, que es representativo de la formación de fibra elástica, se observó en las micrografías TEM, aunque las fibras elásticas formadas eran inmaduras en comparación con la lámina elástica interna (IEL) observada en la imagen TEM de una aorta normal de rata (FIG. 7B).

Inmunotinción

El desarrollo de células endoteliales en la superficie luminal de los injertos se confirmó utilizando la tinción de células endoteliales y tinción del vWF (Factor de von Willebrand). Se utilizaron anticuerpos específicos contra células endoteliales de rata y vWF para identificar la deposición de células endoteliales en la superficie del lumen. Se observaron células endoteliales al cabo de un mes, aunque no cubrían por completo el lumen, tal como se muestra en la FIG. 8A. Se observó una deposición significativa de células endoteliales a los 3 meses, a los 6 meses y a los 12 meses, tal como se muestra en las FIG. 8B, 8C y 8D, respectivamente. La tinción inmunohistológica por vWF mostró que la totalidad de la superficie del injerto estaba recubierta de endotelio, tal como muestran las FIG. 8E-8H.

La repoblación del injerto vascular con células de músculo liso y fibroblastos se verificó mediante tinción con anticuerpos específicos contra la actina alfa del músculo liso y vimetina, respectivamente. También se tiñeron secciones transversales de la aorta abdominal de la rata con anticuerpos contra actina alfa del músculo liso y fibroblastos para utilizarlas como control (FIG. 9A y 9F, respectivamente). Los injertos al cabo de un mes (FIG. 9B y 9G), a los 3 meses (FIG. 9C y 9H), a los 6 meses (FIG. 9D y 9I) y a los 12 meses (FIG. 9E y 9J) mostraron una repoblación del injerto con células de músculo liso y fibroblastos a partir de un mes después de la implantación.

Respuesta inflamatoria e inmune

Las secciones explantadas se tiñeron con anticuerpos contra linfocitos T, linfocitos B y macrófagos de rata, con el objeto de identificar la respuesta inflamatoria del huésped frente al injerto implantado. Las FIG. 10A-10D representan injertos teñidos con anticuerpos contra linfocitos T de rata al cabo de un mes, a los 3 meses, a los 6 meses y a los 12 meses, respectivamente. De forma similar, las FIG. 10E-10H representan injertos teñidos con anticuerpos contra linfocitos B, y las FIG. 10I-10L representan injertos teñidos con anticuerpos contra macrófagos. Se observó que los tres tipos de células inflamatorias se infiltraron en los injertos implantados de forma moderada al mes, aunque no se detectó ninguna infiltración de células inflamatorias en los neomedios. Las células inflamatorias se redujeron de forma significativa a los tres meses y las que se observaron se encontraban principalmente cerca de la periferia del injerto. Después de seis meses no se observaban células inflamatorias.

De forma similar, se observó un nivel moderado de anticuerpos IgG en los injertos durante los tres primeros meses, pero no en los neomedios. Se examinó la IgG (FIG. 11A-11E) e IgM de rata (FIG. 11F-11J) unidas a los injertos vasculares al cabo de un mes (FIG. 11A y 11F), a los 3 meses (FIG. 11B y 11G), a los 6 meses (FIG. 11C y 11H) y a los 12 meses (FIG. 11D y 11I). Se utilizó como control una aorta abdominal normal de rata (FIG. 11E y 11J). Como se muestra en las FIG. 11A-11D, se descubrió un nivel moderado de anticuerpo IgG en el injerto durante los tres primeros meses. Después de tres meses, el nivel de IgG se redujo de forma significativa. No se observó una deposición de IgM en ningún injerto durante el estudio.

Ejemplo 2. Evaluación de la solidez mecánica, termoestabilidad y efecto trombótico de los injertos vasculares fabricados con bioadhesivos.

Para este estudio se utilizaron injertos vasculares obtenidos de matriz dérmica acelular humana (HADM). Las láminas de HADM se enrollaron para formar estructuras tubulares y los bordes de la lámina se unieron utilizando cola de fibrina. La resistencia a la rotura de los injertos se evaluó utilizando un ensayo de rotura (código del Instituto Nacional de Normalización Estadounidense (ANSI): ANSI/AAMI/ISO 7198:1998/2001/©2004). Se calculó que la resistencia máxima a la rotura era de 1639 ± 432 mmHg ($n=2$), lo que indicaba que los injertos vasculares fabricados utilizando bioadhesivos eran lo suficientemente sólidos para soportar las presiones sanguíneas fisiológicas.

Las temperaturas de inicio de la desnaturalización del colágeno en las matrices dérmicas se determinaron mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). Como se muestra en el gráfico de la FIG. 12, la temperatura de desnaturalización de los injertos vasculares fabricados con cola fue más favorable, en comparación con la de las matrices dérmicas acelulares humanas. El gráfico incluye datos que corresponden a la temperatura de inicio de la desnaturalización de una HADM sin tratar y de los injertos vasculares formados pegando la HADM con DERMABOND®, adhesivos a base de fibrinógeno y chitosán.

Los datos de este experimento indican que los bioadhesivos no alteraron las propiedades bioquímicas de la matriz.

Se evaluó la eficacia de los agentes antitrombóticos (como la heparina) sobre los injertos vasculares fabricados con cola, utilizando un método de formación de coágulos. El recubrimiento de heparina se realizó suspendiendo los injertos vasculares en una solución de sales de heparina de sodio al 0,4% durante 24 horas a temperatura ambiente. Se añadieron 200 μ l de sangre y 12.5 μ l de 100 mM CaCl_2 a la superficie luminal de secciones de 1 cm^2 de los injertos vasculares y, a continuación, las secciones de los injertos se pusieron en una incubadora durante una hora a 37 °C con CO_2 al 5%. Se retiraron todos los coágulos visibles de la superficie con unas pinzas, se colocaron en un tubo, se liofilizaron y se pesaron. Como se muestra en el gráfico de la FIG. 13, la propiedad antitrombótica de la heparina no se vio afectada cuando esta sustancia entró en contacto con un bioadhesivo. El gráfico incluye datos que corresponden al peso de los coágulos sanguíneos formados en la HADM sin tratar, en la HADM tratada con heparina (HADM + Hep), en la cola de fibrinógeno (FG) y en la HADM tratada tanto con heparina como con cola de fibrinógeno (HADM + FG + Hep). Como se muestra en el gráfico, la cantidad de coágulos de sangre formados en la HADM tratada tanto con heparina como con cola de fibrinógeno fue más favorable, en comparación con los datos sobre coágulos de sangre de la HADM tratada con heparina, lo que indica que la cola de fibrinógeno no interfirió en la función antitrombótica del revestimiento de heparina de las matrices dérmicas.

REIVINDICACIONES

1. Un injerto vascular, que consiste en:
5 un conducto tubular compuesto por una pared tubular, que delimita un lumen para el paso de la sangre a través del mismo; y
donde la pared tubular comprende una matriz de tejido acelular, formada por un tejido que incluye una membrana basal, donde la matriz acelular comprende dicha membrana basal, formando la membrana basal la superficie luminal de la pared tubular.
- 10 2. El injerto vascular de la reivindicación 1, donde un primer borde longitudinal de la matriz de tejido acelular se une a un segundo borde longitudinal de la matriz de tejido acelular para formar una costura impermeable que se extiende a lo largo del injerto.
3. El injerto vascular de la reivindicación 1, donde la unión del primer borde longitudinal con el segundo borde longitudinal crea una cresta longitudinal que sobresale de la superficie abluminal de la pared tubular.
- 15 4. El injerto vascular de la reivindicación 2, donde el primer borde longitudinal y el segundo borde longitudinal se unen utilizando al menos una sutura y al menos un adhesivo.
5. El injerto vascular de la reivindicación 2, donde el primer borde longitudinal se extiende sobre el segundo borde longitudinal para formar una región solapada de múltiples capas.
- 20 6. El injerto vascular de la reivindicación 7 donde las capas de la región solapada están unidas unas a otras.
7. El injerto vascular de la reivindicación 1, donde la matriz de tejido acelular comprende al menos una matriz dérmica, una matriz de tejido pericárdico o una membrana peritoneal.
8. El injerto vascular de la reivindicación 7, donde la matriz dérmica se obtiene de piel humana.
- 25 9. El injerto vascular de la reivindicación 1, donde la matriz de tejido acelular se obtiene de tejido que es xenogénico para un receptor humano.
10. El injerto vascular de la reivindicación 9, donde el tejido procede de un cerdo con deficiencia de α 1,3-galactosiltransferasa (α 1,3QT).
11. El injerto vascular de la reivindicación 1, donde la matriz de tejido acelular se obtiene de tejido que es alogénico para un receptor humano.
- 30 12. El injerto vascular de la reivindicación 1, donde la matriz de tejido acelular comprende múltiples láminas superpuestas.
13. El injerto vascular de la reivindicación 1, donde la matriz de tejido acelular es tratada con factores de crecimiento que promueven la remodelación del tejido.
- 35 14. El injerto vascular de la reivindicación 1, donde la membrana basal es tratada con agentes antitrombóticos.
15. El injerto vascular de la reivindicación 1, donde la membrana basal es tratada con agentes anticalcificantes.

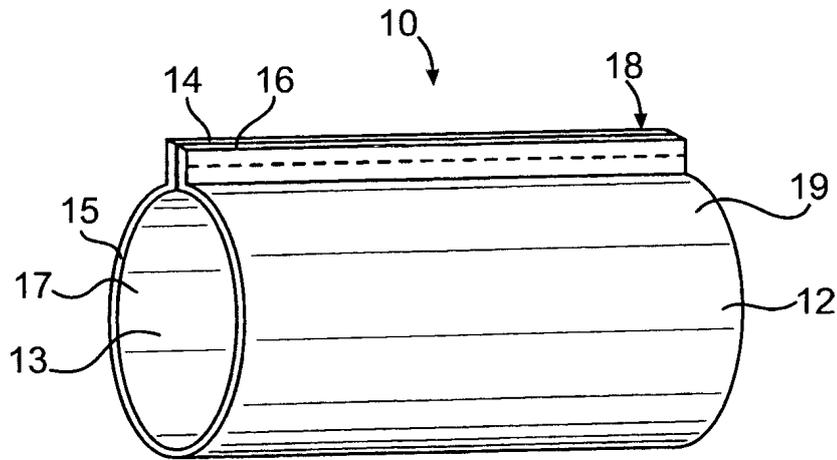


FIG. 1A

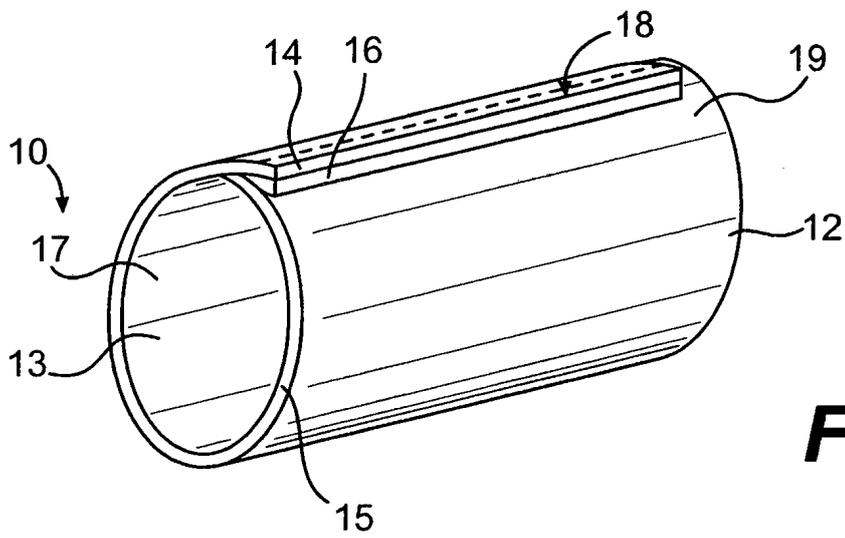
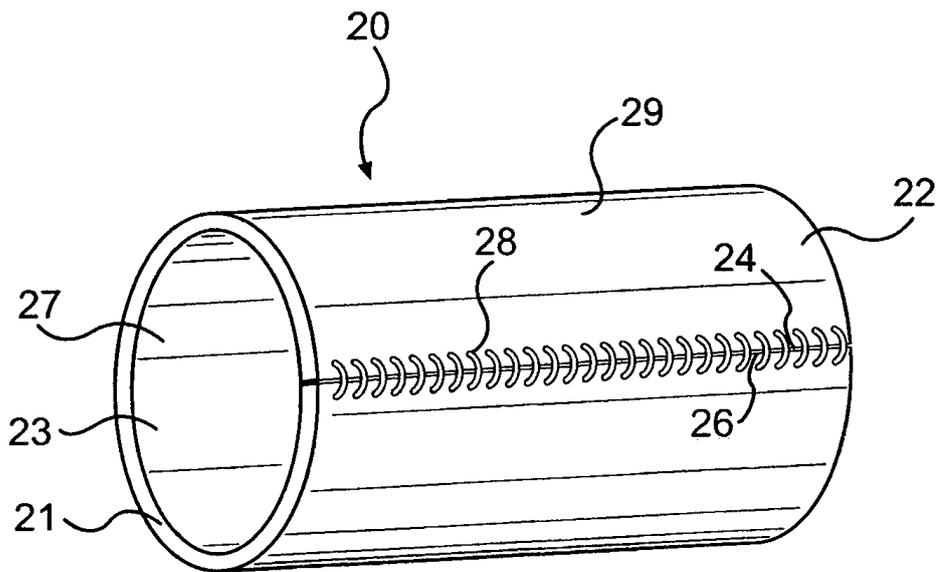
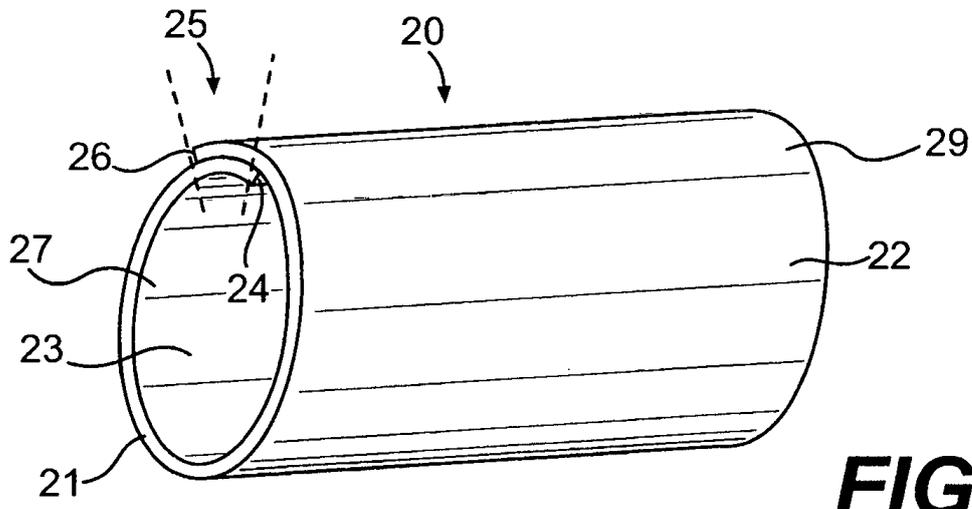


FIG. 1B



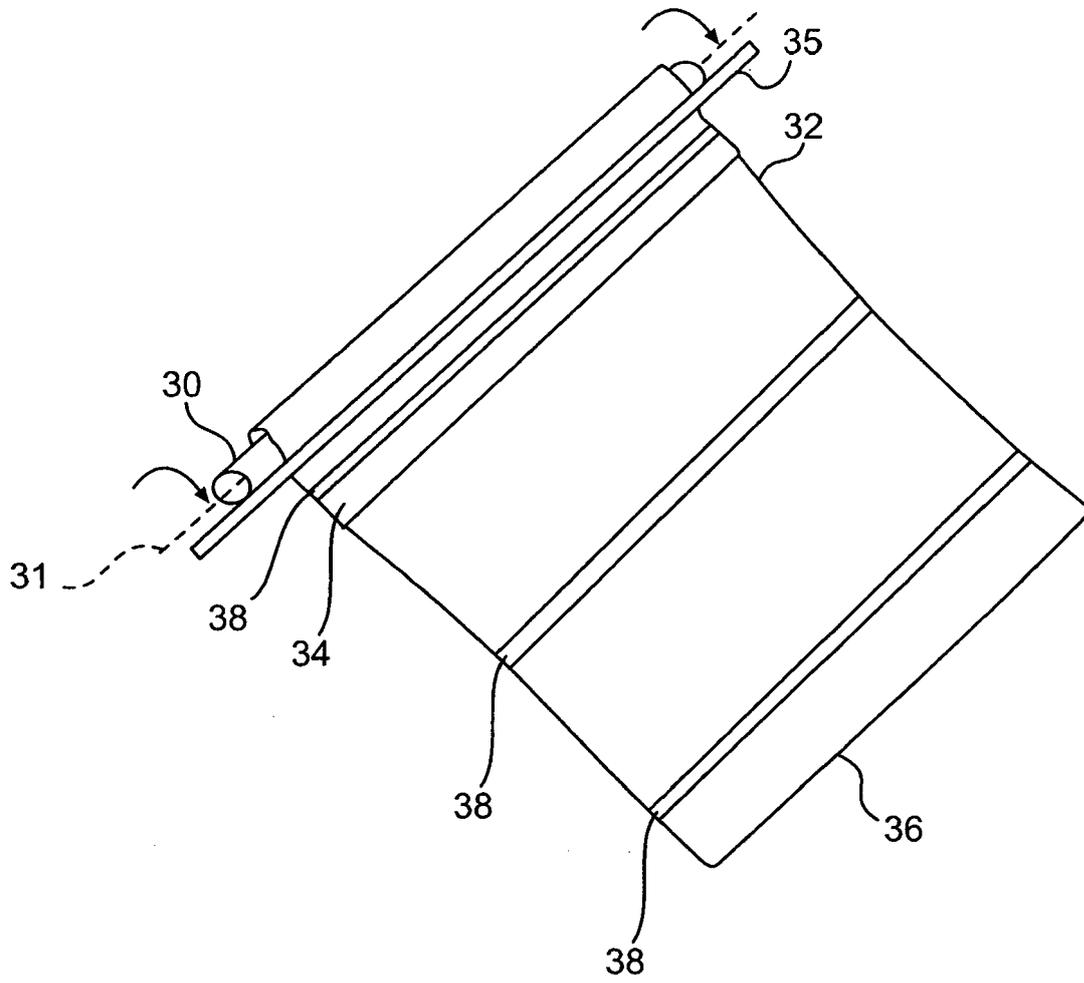


FIG. 3

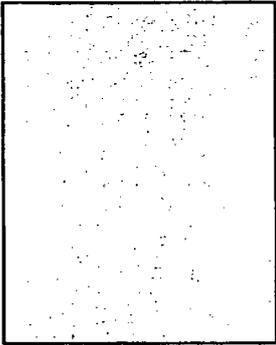


FIG. 4A



FIG. 4B



FIG. 4C

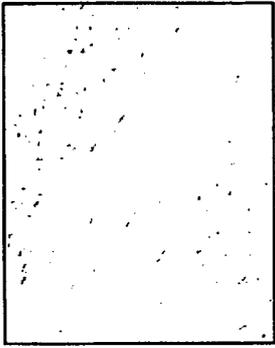


FIG. 4D



FIG. 4E



FIG. 4F

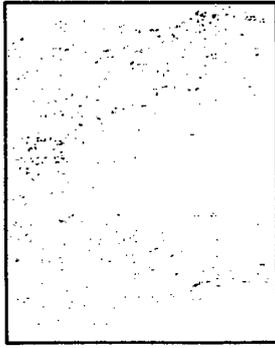


FIG. 4G

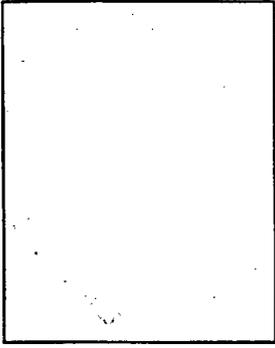


FIG. 4H



FIG. 5C

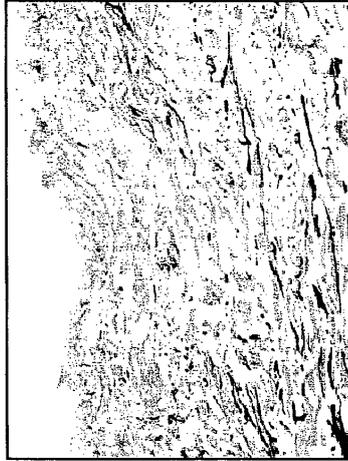


FIG. 5F

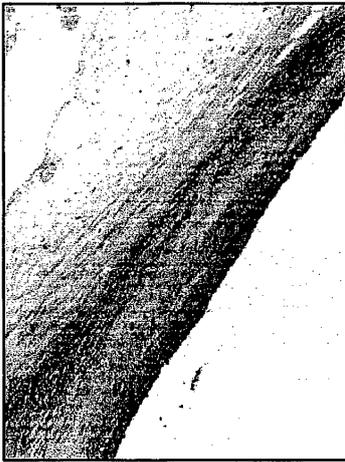


FIG. 5B



FIG. 5E



FIG. 5A



FIG. 5D



FIG. 6A

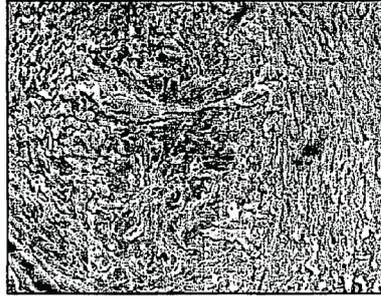


FIG. 6B



FIG. 6C

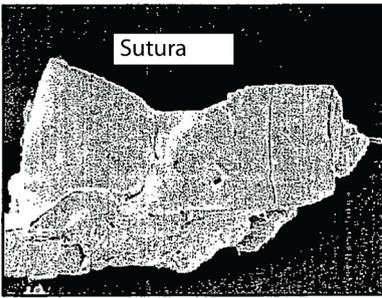


FIG. 6D

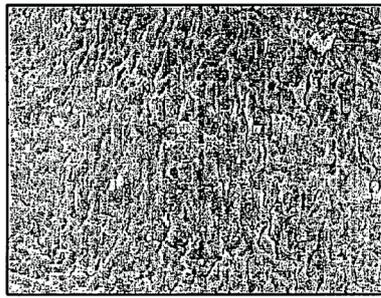


FIG. 6E

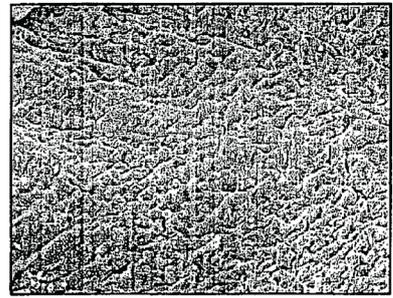


FIG. 6F

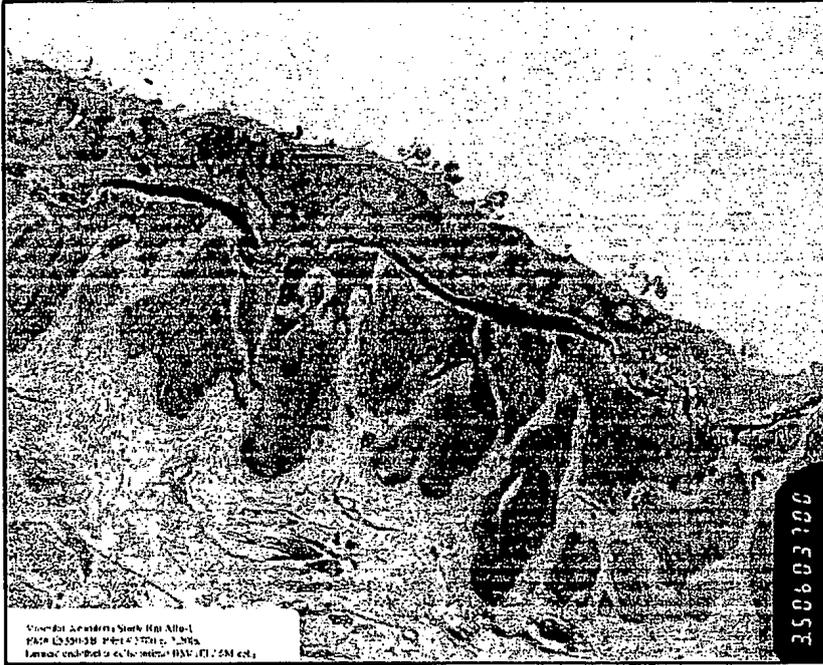


FIG. 7B

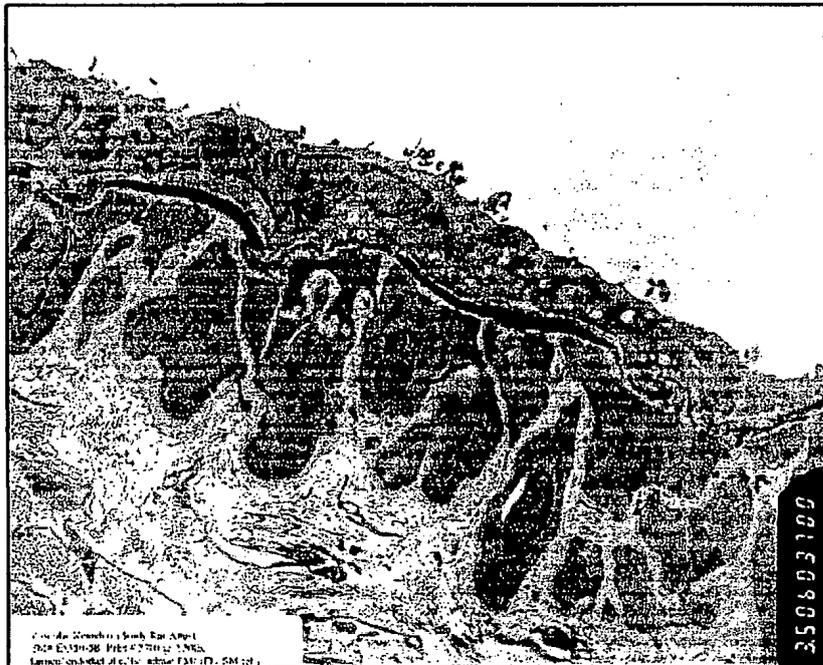


FIG. 7A

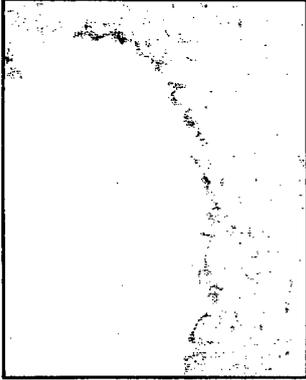


FIG. 8D



FIG. 8C



FIG. 8B

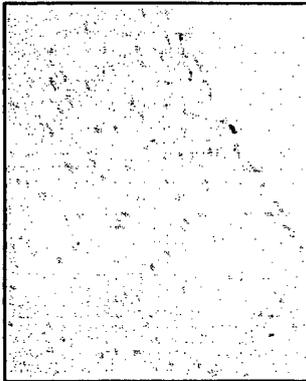


FIG. 8A

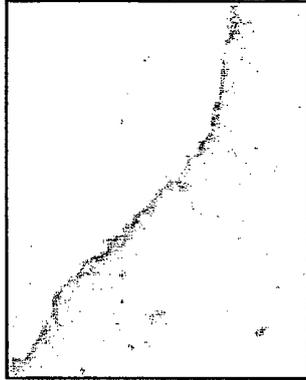


FIG. 8H

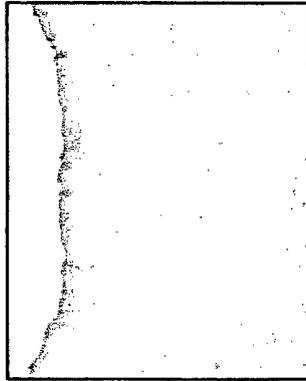


FIG. 8G

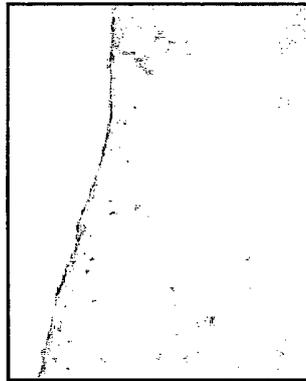


FIG. 8F

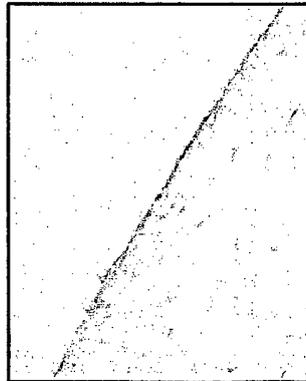


FIG. 8E

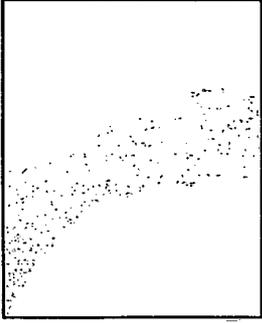


FIG. 9E

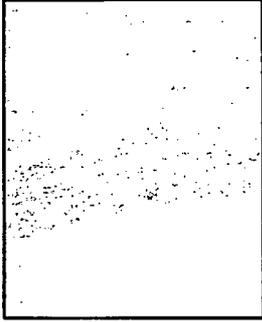


FIG. 9D



FIG. 9C



FIG. 9B

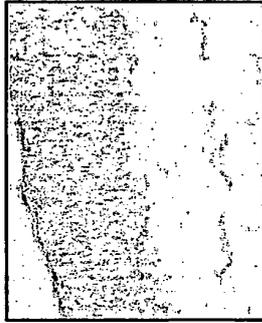


FIG. 9A

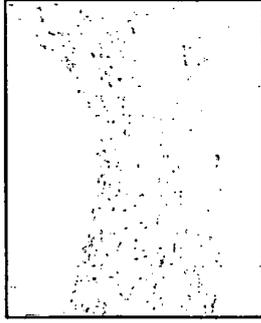


FIG. 9J



FIG. 9I

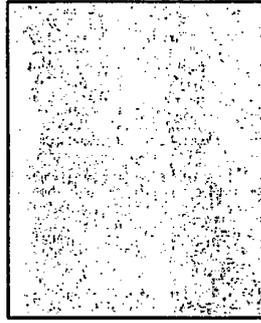


FIG. 9H



FIG. 9G



FIG. 9F

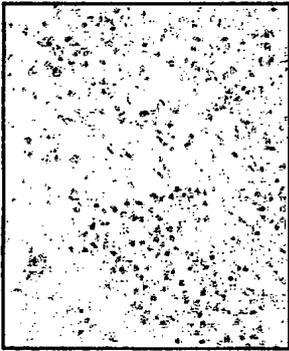


FIG. 10A



FIG. 10B



FIG. 10C

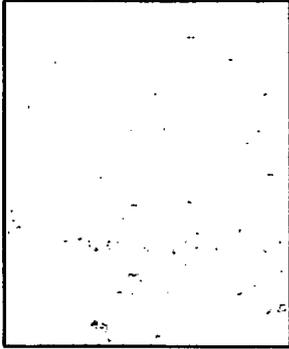


FIG. 10D



FIG. 10E



FIG. 10F



FIG. 10G



FIG. 10H



FIG. 10I



FIG. 10J

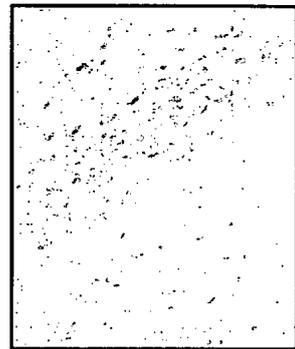


FIG. 10K

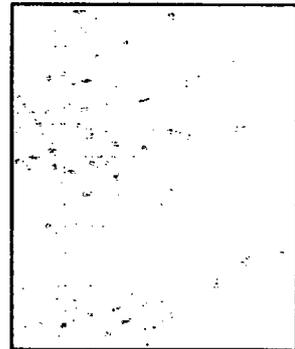


FIG. 10L

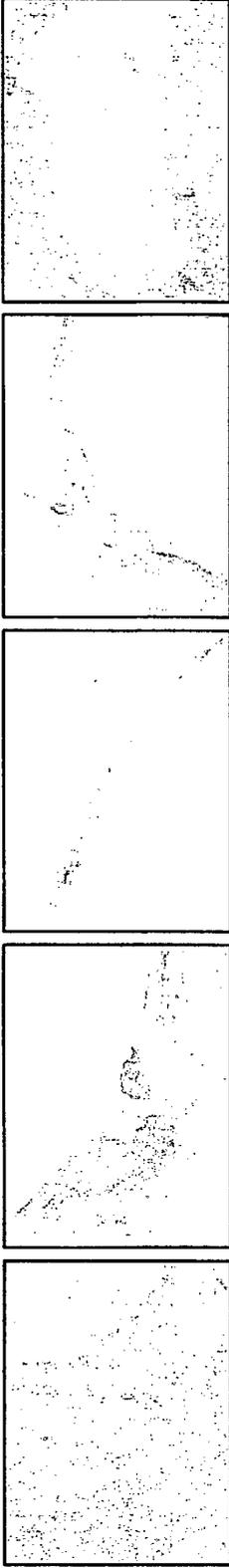


FIG. 11A FIG. 11B FIG. 11C FIG. 11D FIG. 11E

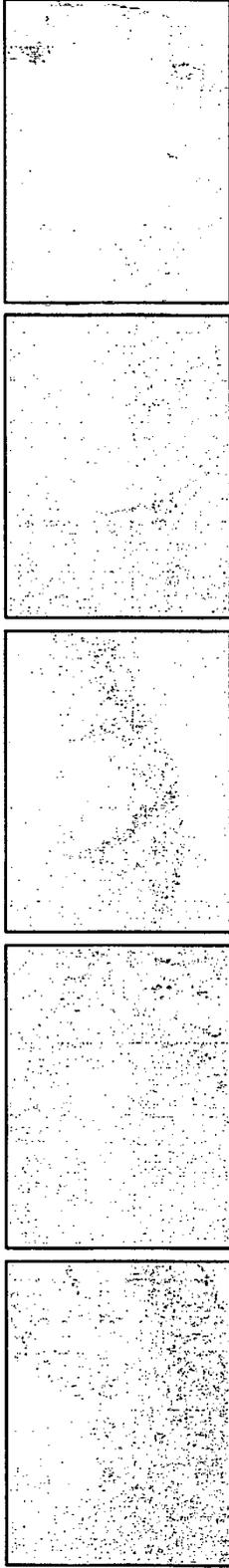


FIG. 11F FIG. 11G FIG. 11H FIG. 11I FIG. 11J

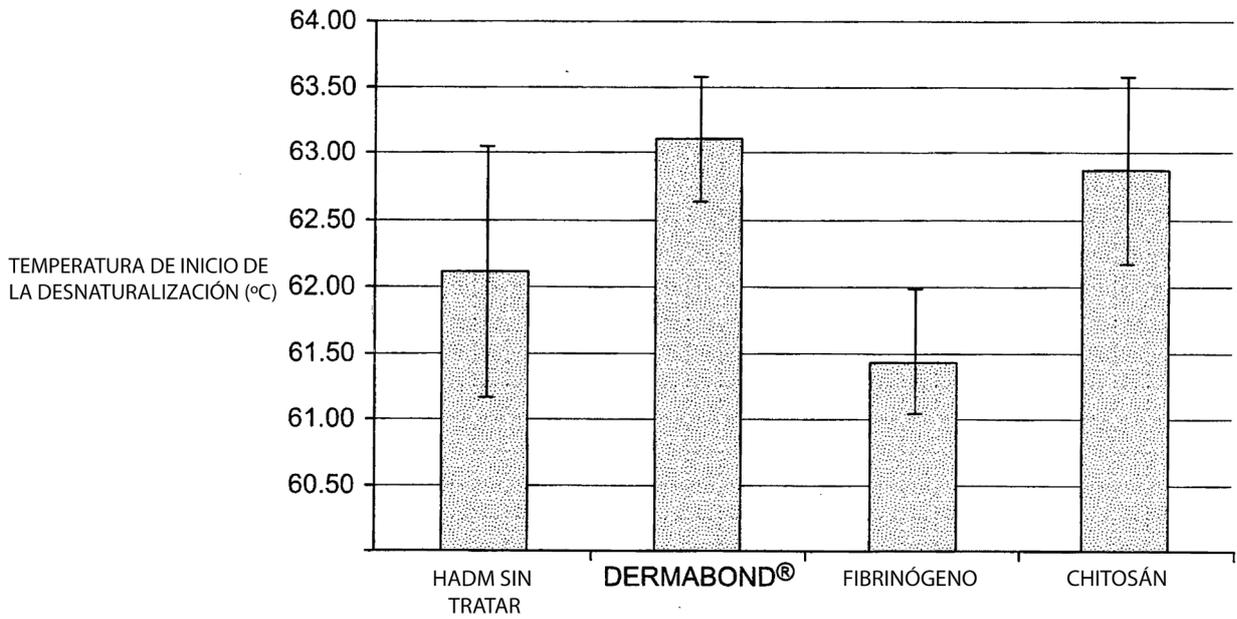


FIG. 12

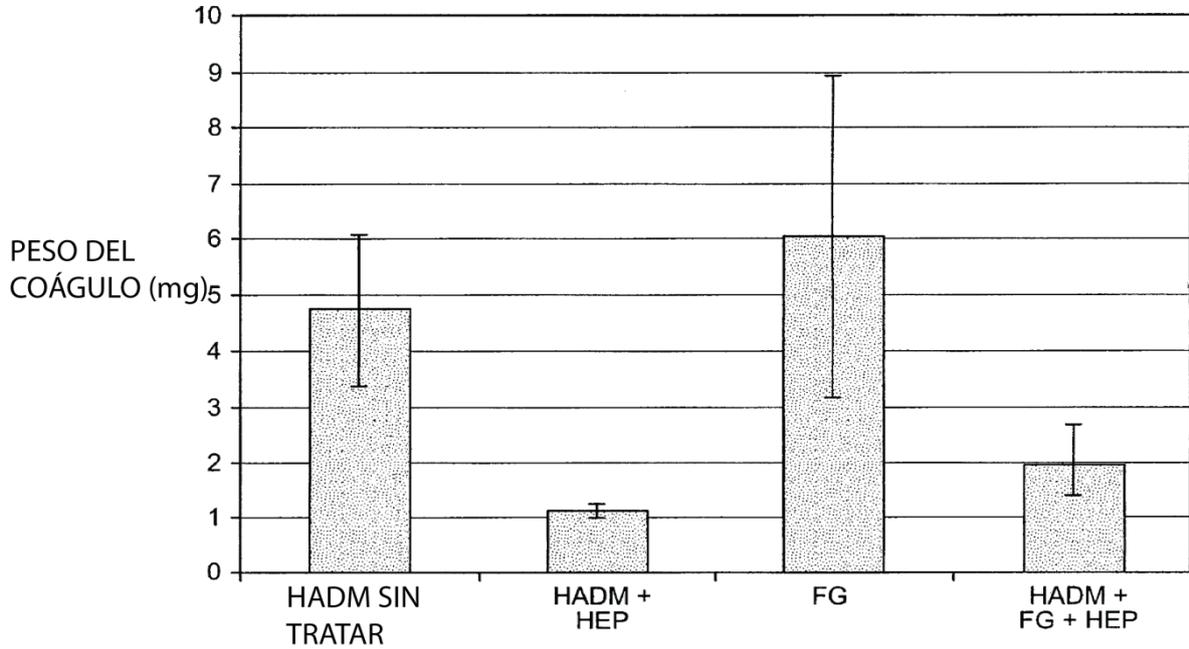


FIG. 13