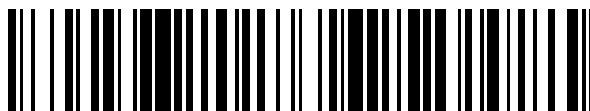


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 684**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/12** (2015.01)  
**A61F 2/06** (2013.01)  
**A61K 47/36** (2006.01)  
**A61K 47/42** (2006.01)  
**C12N 5/071** (2010.01)  
**A61L 27/38** (2006.01)  
**A61L 29/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.06.2006 E 06772165 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2015 EP 1901680**

54 Título: **Crioconservación de material biocompatible**

30 Prioridad:

**21.06.2005 US 692708 P**  
**06.12.2005 WO PCT/US2005/043967**

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

**23.07.2015**

73 Titular/es:

**SHIRE REGENERATIVE MEDICINE, INC. (100.0%)**  
**11095 Torreyana Road**  
**San Diego, California 92121, US**

72 Inventor/es:

**NUGENT, HELEN MARIE;**  
**EDELMAN, ELAZER;**  
**DALAL, ANUPAM;**  
**BOLLINGER, STEVE y**  
**EPPERLY, SCOTT**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 541 684 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

Crioconservación de material biocompatible

5 Antecedentes de la invención

10 La insuficiencia de acceso vascular es la principal complicación al proporcionar cuidado a pacientes en hemodiálisis para tratar la enfermedad renal en etapa terminal (ERET). La velocidad de casos ERET existentes en los Estados Unidos ha aumentado cada año desde 1980. En el 2001 la velocidad de frecuencia alcanzó casi 1.400 pacientes por cada millón de población, un aumento del 2,4 por ciento desde el año anterior. Basándose en cambios demográficos en edad, raza, etnicidad y estado diabético, se espera que aumente la frecuencia de la población con ERET en Estados Unidos a 1,3 millones en 2030. Actualmente, aproximadamente el 65 % de la frecuencia de la población con ERET se trata con hemodiálisis (aproximadamente 264.710 pacientes). Entre 1997 y 2001, la frecuencia de la población de hemodiálisis aumentó a 4,5 % por año. Usando los datos de Medicare, se ha determinado que en el 15 2001 los costes totales de la ERET alcanzaron 15,5 miles de millones de dólares, el 6,4 % del presupuesto de Medicare total de 242 miles de millones de dólares (los costes totales alcanzaron 22,8 miles de millones de dólares de todas las fuentes). De hecho, el coste anual de la morbilidad relacionada con el acceso vascular en los Estados Unidos actualmente supera los 1000 millones de dólares por año.

20 La insuficiencia de acceso vascular es la única causa más importante de morbilidad en la población con hemodiálisis. Un reciente informe que analiza los datos del Sistema de Datos Renales de EE.UU. (USRDS) descubrió una velocidad de permeabilidad de acceso no asistida primaria global de tan solo el 53 % en 1 año. Las velocidades de permeabilidad de acceso no asistida primaria en 1 año fueron del 49 % para estructuras de acceso vascular tales como injertos arteriovenosos que implican puentes prostéticos de ePTFE® y el 62 % para las fístulas arteriovenosas (AV). Las velocidades de permeabilidad acumulativa para los accesos por primera vez a 1, 3 y 5 años fueron del 54 %, 46 % y 36 % para las fístulas de antebrazo y 54 %, 28 % y 0 % para los injertos AV, respectivamente. Actualmente, el uso de injertos que implican puentes prostéticos de ePTFE representa el 70 % de todos los métodos de acceso de hemodiálisis en los Estados Unidos, la Fundación National Kidney actualmente recomienda que las fístulas AV sean el método preferido de acceso vascular. Se espera que habrá un aumento en la proporción de nuevas fístulas AV en los Estados Unidos en el futuro.

35 Las fístulas arteriovenosas autógenas se han considerado históricamente como la mejor elección para acceso vascular en pacientes sometidos a hemodiálisis. Cuando una fístula AV madura satisfactoriamente después de la creación quirúrgica, ésta puede funcionar durante años con un bajo riesgo de complicaciones y una baja frecuencia de revisiones. Sin embargo, las velocidades descritas de fístulas AV sin maduración varían ampliamente, aunque permanecen aproximadamente del 20-50 %. La no maduración se define generalmente como la incapacidad de permitir una canulación repetitiva de la fístula para la diálisis u obtener suficiente flujo sanguíneo para diálisis dentro de los 12 meses después de la creación quirúrgica. La presencia de no maduración de una fístula AV puede depender, en parte, de la calidad y del tamaño de los vasos usados para formar la fístula AV. Se ha observado que la evaluación preoperatoria de las características de los vasos tiene efectos beneficiosos en la identificación de vasos adecuados para la creación de fístulas AV.

45 La insuficiencia de las estructuras de acceso vascular es atribuible al efecto acumulativo de una variedad de distintos fenómenos agudos y crónicos, especialmente en el denominado "pie" de la anastomosis y sus alrededores aguas abajo. Por ejemplo, los injertos AV pueden desarrollar estenosis asociadas con injerto y oclusiones asociadas con injerto en las anastomosis del lado anastomótico venoso. En un informe publicado, un examen histológico de segmentos extraídos de pacientes con estenosis anastomótica asociada con injerto reveló hiperplasia de la íntima consistente en células musculares lisas y matriz extracelular. La trombosis por injerto también puede contribuir a insuficiencia de acceso vascular en injertos de diálisis ePTFE. Además, generalmente el aislamiento de venas y arterias seguido de la exposición del segmento venoso al flujo sanguíneo arterial y la presión puede causar lesión por isquemia y reperfusión inevitable. La manipulación quirúrgica, tal como la suturación también puede dar como resultado un traumatismo directo en el endotelio y en las células de la musculatura lisa de la media tanto en venas como en arterias. La lesión del endotelio de la arteria y la vena durante la creación de una anastomosis nativa o de injerto puede influir en las velocidades de permeabilidad y oclusión. Además del traumatismo físico asociado con el corte y sutura de venas y arterias durante la formación de una estructura de acceso vascular, el estrés de la pared aumenta y la fuerza de cizalla también puede causar lesión física y/o bioquímica al endotelio. Se ha sugerido que la presión arterial puede alterar la producción normal de compuestos reguladores del crecimiento endotelial así como producir cambios morfológicos y bioquímicos en la media de la vena.

60 La terapia actual para la insuficiencia de acceso vascular es bien la revisión quirúrgica o la angioplastia con o sin implantación de estent. El tratamiento quirúrgico puede ser arriesgado en estos pacientes típicamente con morbilidad múltiple y los resultados a largo plazo de la angioplastia e implantación de estent son generalmente desalentadores debido a sus propias tasas de insuficiencia. El objetivo de mejorar los accesos vasculares para fines de hemodiálisis así como para la circulación periférica es, por lo tanto, mantener la integridad anatómica del sitio de injerto original para permitir velocidades de flujo sanguíneo que soporten el tratamiento de diálisis o suficiente flujo sanguíneo en sitios de derivación periféricos.

Continúan siendo difíciles de alcanzar otros factores que contribuyan al éxito de la maduración de una estructura de acceso vascular recién creada o maduración prolongada de una estructura de acceso vascular ya existente. Además, se han realizado relativamente pocos ensayos clínicos aleatorios en el campo de prevención de la insuficiencia de acceso vascular. Los estudios que han evaluado las causas de la insuficiencia de acceso vascular han alcanzado conclusiones incoherentes. De hecho, hasta el momento, a pesar de la enormidad de este problema, ninguna de las medidas quirúrgicas, terapéuticas o farmacológicas eficaces para la supervivencia prolongada de funcionamiento de fístulas de acceso de diálisis se encuentra disponible para los médicos. Claramente existe una necesidad de seguir avanzando en esta área vital de atención al paciente.

10 Sumario de la invención

La presente invención proporciona un material implantable crioconservado y métodos como se define en las reivindicaciones adjuntas a las mismas.

15 Breve descripción de los dibujos

En los dibujos, los caracteres de referencias similares generalmente se refieren a las mismas partes en todas las vistas diferentes. Además, los dibujos no están necesariamente a escala o proporción, poniendo generalmente en su lugar énfasis en la ilustración de los principios de la invención.

20 La FIG. 1 es una vista esquemática en perspectiva de una forma plana flexible de material implantable para la administración a una superficie exterior de una estructura anatómica tubular de acuerdo con una realización ilustrativa de la invención.

25 La FIG. 2A es una vista esquemática en perspectiva de una forma plana flexible perfilada de material implantable para la administración en una superficie exterior de una estructura anatómica tubular de acuerdo con una realización ilustrativa de la invención.

30 Las FIGS. 2B, 2C, 2D, 2E, 2F y 2G son vistas esquemáticas en perspectiva de una forma plana flexible perfilada del material implantable que comprende una ranura de acuerdo con diversas realizaciones ilustrativas de la invención.

35 Las FIGS. 3A y 3B son curvas de crecimiento celular representativas de acuerdo con una realización ilustrativa de la invención.

Las FIGS. 4A, 4B y 4C ilustran una serie de etapas para administrar formas planas flexibles múltiples de material implantable a una superficie exterior de una anastomosis vascular desde una vista en perspectiva superior de acuerdo con una realización ilustrativa de la invención.

40 La FIG. 5 es una vista en perspectiva superior de una forma perfilada de material implantable administrada a una superficie exterior de una anastomosis vascular de acuerdo con una realización ilustrativa de la invención.

45 La FIG. 6 es una vista en perspectiva superior de una forma plana flexible de material implantable administrado a una estructura anatómica tubular de acuerdo con una realización ilustrativa de la invención.

La FIG. 7 es un diagrama de flujo de un método de preparación, conservación y transporte de un material implantable para la administración a un receptor de acuerdo con una realización ilustrativa de la invención.

50 Descripción detallada de la invención

Fuente Celular. Como se describe en el presente documento, el material implantable de la presente invención comprende células. Las células pueden ser alogénicas, xenogénicas o autólogas. En determinadas realizaciones, una fuente de células vivas puede proceder de un donante adecuado. En determinadas otras realizaciones, una fuente de células puede proceder de un cadáver o de un banco de células.

55 En una realización actualmente preferida, las células son células endoteliales. En una realización particularmente preferida, dichas células endoteliales se obtienen de tejido vascular, preferentemente pero no limitado a tejido arterial. Como se ejemplifica más adelante, un tipo de células endoteliales vasculares adecuadas para su uso es una célula endotelial aórtica. Otro tipo de célula endotelial vascular adecuada para su uso son células endoteliales de la vena del cordón umbilical. Y, otro tipo de célula endotelial vascular adecuada para su uso son las células endoteliales arteriales coronarias. Incluso otros tipos de células endoteliales vasculares adecuadas para su uso con la presente invención incluyen células endoteliales de arteria pulmonar y células endoteliales de arteria ilíaca.

65 En otra realización actualmente preferida, las células endoteliales adecuadas pueden obtenerse de tejido no vascular. El tejido no vascular puede proceder de cualquier estructura anatómica tubular como se describe en cualquier parte del presente documento o puede proceder de cualquier tejido u órgano no vascular.

Incluso en otra realización, las células endoteliales pueden proceder de células progenitoras endoteliales o células madre; en otra realización más, las células endoteliales pueden proceder de células progenitoras o células madre generalmente. En otras realizaciones preferidas, las células pueden ser células no endoteliales que son alogénicas, xenogénicas o autólogas procedentes de tejidos u órganos vasculares o no vasculares. La presente invención también contempla cualquiera de las anteriores las cuales están genéticamente alteradas, modificadas, o modificadas genéticamente.

En una realización adicional, se co-cultivan dos o más tipos de células para preparar la presente composición. Por ejemplo, una primera célula puede introducirse en el material implantable biocompatible y cultivarse hasta alcanzar la confluencia. El primer tipo de célula puede incluir, por ejemplo, células de la musculatura lisa, fibroblastos, células madre, células endoteliales progenitoras, una combinación de células de musculatura lisa y fibroblastos, cualquier otro tipo de células deseado o una combinación de tipos de células deseados adecuados para crear un entorno conductor para el crecimiento de células endoteliales. Una vez que el primer tipo celular ha alcanzado la confluencia, se siembra un segundo tipo de célula en la parte superior del primer tipo celular confluyente en, o dentro de la matriz biocompatible y se cultiva hasta que tanto el primer tipo de células como el segundo tipo de células ha alcanzado la confluencia. El segundo tipo de células puede incluir, por ejemplo, células endoteliales o cualquier otro tipo de células deseado o una combinación de tipos de células. Se contempla que el primer y segundo tipo de células pueden producirse gradualmente, o como una mezcla sencilla. También se contempla que la densidad celular pueda modificarse para alterar la proporción de células de la musculatura lisa con respecto a las células endoteliales.

Para impedir la sobre-proliferación de células de la musculatura lisa u otro tipo de células propensas a la proliferación excesiva, puede modificarse el método de cultivo. Por ejemplo, después de la confluencia del primer tipo de células, el cultivo puede cubrirse con un factor de unión adecuado para el segundo tipo de células antes de la introducción del segundo tipo de células. Los factores de unión ejemplares incluyen el recubrimiento del cultivo con gelatina para mejorar la unión de las células endoteliales. De acuerdo con otra realización, puede añadirse heparina al medio de cultivo durante el cultivo del segundo tipo de células para reducir la proliferación del primer tipo de células y para optimizar la proporción deseada del primer tipo de células con respecto al segundo tipo de células. Por ejemplo, después de un crecimiento inicial de células de la musculatura lisa, puede administrarse heparina para controlar el crecimiento de las células de la musculatura lisa para conseguir una proporción más grande de células endoteliales con respecto a células de la musculatura lisa.

En una realización preferida, se crea un co-cultivo sembrando primero un material implantable biocompatible con células de la musculatura lisa para crear las estructuras del vaso. Una vez que las células de la musculatura lisa han alcanzado la confluencia, las células endoteliales se siembran en la parte superior de las células de la musculatura lisa cultivadas en el material implantable para crear un vaso sanguíneo simulado. Esta realización puede administrarse, por ejemplo, a un injerto AV o a un injerto de derivación periférica de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento para promover la integración del material de injerto prostético.

Todo lo que se requiere de las células de la presente composición es que presenten uno o más fenotipos preferidos o propiedades funcionales. Como se ha descrito anteriormente en el presente documento, la presente invención se basa en el descubrimiento de que una célula que tiene un fenotipo fácilmente identificable cuando se asocia con una matriz preferida (descrita en cualquier parte del presente documento) puede facilitar, restablecer y/o de otra manera modular la fisiología de las células endoteliales vasculares y/o la homeostasis luminal asociada con el tratamiento de estructuras de acceso vascular tales como las fistulas arteriovenosas o el injerto arteriovenoso.

Para los fines de la presente invención, uno de dichos fenotipos preferidos, fácilmente identificables típicos de las células de la presente invención es una capacidad para inhibir o de otra manera interferir con la proliferación de las células de la musculatura lisa vascular como se mide mediante ensayos *in vitro* descritos más adelante. En el presente documento esto se denomina fenotipo inhibidor.

Otro fenotipo fácilmente identificable presentado por las células de la presente composición es que éstas son anti-trombóticas o son capaces de inhibir la adhesión y agregación plaquetaria: la actividad anti-trombótica puede determinarse usando un ensayo con heparán sulfato *in vitro* y/o un ensayo de agregación plaquetaria *in vitro* descrito más adelante.

En una realización operativa típica de la presente invención, las células no requieren presentar más de un tipo de los fenotipos anteriores. En determinadas realizaciones, las células pueden presentar más de uno de los fenotipos anteriores.

Aunque cada uno de los fenotipos anteriores tipifica una célula endotelial funcional, tal como, pero sin limitación una célula endotelial vascular, una célula no endotelial que presenta dicho(s) fenotipo(s) se considera de tipo endotelial para los fines de la presente invención y por tanto adecuada para su uso con la presente invención. Las células que son de tipo endotelial también se mencionan como análogos funcionales de células endoteliales; o imitadores funcionales de células endoteliales en el presente documento. Por tanto, únicamente a modo de ejemplo, las células adecuadas para su uso con los materiales y métodos divulgados en el presente documento también incluyen células madre o células progenitoras que dan lugar a células de tipo endotelial; células que son células que no son células

endoteliales en origen aunque actúan funcionalmente igual que una célula endotelial usando parámetros establecidos en el presente documento; las células de cualquier origen que se obtienen por ingeniería genética o se modifican de otra manera para tener funcionalidad de tipo endotelial usando los parámetros expuestos en el presente documento.

5 Típicamente, las células de la presente invención presentan uno o más de los fenotipos anteriormente mencionados cuando están presentes en poblaciones confluentes, casi confluentes o post-confluentes y se asocian con una matriz biocompatible preferida tal como la descrita en cualquier parte del presente documento. Como apreciará un experto habitual en la materia, las poblaciones confluentes, casi confluentes o post-confluentes de células se identifican fácilmente mediante diversas técnicas, siendo la más común y ampliamente aceptada el examen microscópico directo. Otras incluyen la evaluación del número de células por área de superficie usando técnicas de recuento celular convencionales tales como, pero sin limitación, un hemocitómetro o un contador de Coulter.

15 Adicionalmente, para los fines de la presente invención, las células de tipo endotelial incluyen, pero sin limitación, células que emulan o imitan a las células endoteliales funcional y fenotípicamente confluentes, casi confluentes o post-confluentes como se mide mediante los parámetros expuestos en el presente documento.

20 Por tanto, usando la descripción detallada y las guías expuestas a continuación, el experto habitual en la materia apreciará cómo preparar, usar, ensayar e identificar realizaciones operativas del material implantable divulgado en el presente documento. Es decir, las enseñanzas proporcionadas en el presente documento divulgan todo lo que es necesario para preparar y usar los materiales implantables de la presente invención. Y además, las enseñanzas proporcionadas en el presente documento divulgan todo lo que es necesario para identificar, preparar y usar composiciones que contienen células operativamente equivalentes. En el fondo, todo lo que se necesita es que las composiciones que contienen células equivalentes sean eficaces para tratar estructuras de acceso vascular de acuerdo con los métodos divulgados en el presente documento. Como apreciará el experto en la materia, las realizaciones equivalentes de la presente composición pueden identificarse usando únicamente la experimentación rutinaria junto con las enseñanzas proporcionadas en el presente documento.

30 En determinadas realizaciones preferidas, las células endoteliales usadas en el material implantable de la presente invención se aíslan de aorta de donantes humanos cadavéricos. Cada lote de células procede de un solo o múltiples donantes, ensayados ampliamente para la pureza de células endoteliales, función biológica, la presencia de bacterias, hongos, patógenos humanos conocidos y otros agentes inesperados. Las células se crioconservan y se depositan en bancos usando técnicas bien conocidas para expansión posterior en cultivo para su formulación posterior en materiales implantables biocompatibles.

35 Preparación de Células. Como se ha indicado anteriormente, pueden obtenerse células adecuadas de una variedad de tipos de tejidos y de tipos de células. En determinadas realizaciones preferidas, se usan células endoteliales aórticas humanas en el material implantable aisladas de la aorta de donantes cadavéricos. En otras realizaciones, se aíslan células endoteliales aórticas porcinas (Cell Applications, San Diego, CA) de aorta porcina normal mediante un procedimiento similar usado para aislar células endoteliales aórticas humanas. Cada lote de células procede de un solo donante o donantes múltiples, ensayado exhaustivamente con respecto a la viabilidad de las células endoteliales, pureza, función biológica, la presencia de micoplasma, bacterias, hongos, levaduras, patógenos humanos conocidos y otros agentes inesperados. Las células se expanden adicionalmente se caracterizan y crioconservan para formar un banco de trabajo de células del tercer a sexto pase usando técnicas bien conocidas para su expansión posterior en cultivo y para su formulación posterior en material implantable biocompatible.

40 Las células endoteliales aórticas humanas o porcinas se prepararan en matraces de T-75 previamente tratados por la adición de aproximadamente 15 ml de medio de crecimiento de células endoteliales por matraz. Las células endoteliales aórticas humanas se preparan en Medio de Crecimiento Endotelial (EGM-2, Cambrex Biosciences, East Rutherford, NJ). El EGM-2 consiste en Medio Basal de Células Endoteliales (EBM-2, Cambrex Biosciences) complementado con alícuotas sencillas de EGM-2, que contienen FBS al 2 %. Las células porcinas se preparan en EBM-2 complementado con FBS al 5 % y gentamicina 50 µg/ml. Los matraces se colocan en una incubadora mantenida a una temperatura de aproximadamente 37 °C y 95 % de aire con CO<sub>2</sub> al 5 % y humedad al 90 % durante un mínimo de 30 minutos. Uno o dos viales de las células se extrae del congelador a -140 °C-160 °C y se descongela a aproximadamente 30 °C. Cada vial de células descongeladas se siembra en matraces T-75 a una densidad de aproximadamente 3 x 10<sup>3</sup> células por cm<sup>3</sup>, preferentemente, pero no inferior a 1,0 x 10<sup>3</sup> y superior a 7,0 x 10<sup>3</sup>; y los matraces que contienen las células vuelven a la incubadora. Después de aproximadamente 8-24 horas, el medio gastado se retira y se vuelve a poner en medio reciente. El medio se cambia cada dos o tres días después de esto hasta que las células alcanzan una confluencia de aproximadamente el 85-100 % preferentemente, pero no menos del 60 % y no más del 100 %. Cuando el material implantable está destinado para aplicación clínica, solo se usa medio libre de antibiótico en el cultivo postdescongelado de células endoteliales aórticas humanas y la fabricación del material implantable de la presente invención.

65 El medio de crecimiento de células endoteliales se retira después y la monocapa de células se lava con 10 ml de solución salina tamponada con HEPES (HEPES). El HEPES se retira, y se añaden 2 ml de tripsina para separar las células de la superficie del matraz T-75. Una vez producida la separación, se añaden 3 ml de solución neutralizante

de tripsina (TNS) para detener la reacción enzimática. Se añaden 5 ml adicionales de HEPES, y las células se enumeran usando un hemocitómetro. La suspensión celular se centrifuga y se ajusta a una densidad de, en el caso de las células humanas, aproximadamente  $1,75 \times 10^6$  células/ml usando EGM-2 sin antibióticos, o en el caso de las células porcinas, aproximadamente  $1,50 \times 10^5$  células/ml usando EBM-2 complementado con FBS al 5 % y gentamicina 50 µg/ml.

Matriz Biocompatible. De acuerdo con la presente invención, el material implantable comprende una matriz biocompatible. La matriz es permisiva para el crecimiento celular y la separación a, o dentro de la matriz. La matriz es flexible y conformable. La matriz puede ser una composición porosa sólida, semisólida o fluida. Para los fines de la presente invención, una composición fluida significa una composición susceptible a la administración usando una inyección o un dispositivo de administración de tipo inyección tal como, pero sin limitación, una aguja, una jeringa o un catéter. Otros dispositivos de administración que emplean extrusión, eyección o expulsión también se contemplan en el presente documento. Se prefieren matrices porosas. Una composición fluida preferida mantiene la forma. La matriz también puede estar en forma de una forma plana flexible. La matriz también puede tener forma de un gel, una espuma, una suspensión, una partícula, un microtransportador, una microcápsula o una estructura fibrosa. Una matriz actualmente preferida tiene forma particulada.

La matriz, cuando se implanta en una superficie exterior de un vaso sanguíneo por ejemplo, puede residir en el sitio del implante durante al menos 56-84 días, preferentemente al menos 7 días, más preferentemente al menos 14 días, más preferentemente al menos 28 días antes de su bioerosión.

Una matriz preferida es Gelfoam® (Pfizer, Nueva York, NY), una esponja de gelatina absorbible (en lo sucesivo en el presente documento "matriz Gelfoam"). La matriz Gelfoam es una esponja quirúrgica porosa y flexible preparada a partir de una solución de gelatina dérmica porcina purificada especialmente tratada.

De acuerdo con otra realización, el material de matriz biocompatible puede ser un material de matriz modificado. Las modificaciones en el material de matriz pueden seleccionarse para optimizar y/o controlar la función de las células, incluyendo el fenotipo de las células (por ejemplo, el fenotipo inhibidor) como se ha descrito anteriormente, cuando las células están asociadas con la matriz. De acuerdo con una realización, las modificaciones del material de matriz incluyen revestir la matriz con factores de unión o péptidos de adhesión que potencian la capacidad de las células para inhibir la proliferación de células de la musculatura lisa para disminuir la inflamación, para aumentar la producción de heparán sulfato, para aumentar la producción de prostaciclina y/o aumentar la producción de TGF-β<sub>1</sub>. Los factores de unión ejemplares incluyen, por ejemplo, fibronectina, gel de fibrina, y ligandos de adhesión celular unidos covalentemente (incluyendo por ejemplo RGD) utilizando química de carbodiimida acuosa convencional. Los ligandos de adhesión celular adicionales incluyen péptidos que tienen secuencias de reconocimiento de adhesión a células, incluyendo pero sin limitación: RGDY, REDVY, GRGDF, GPDSPR, GRGDY y REDV.

De acuerdo con otra realización, la matriz es una matriz distinta de Gelfoam. Materiales de matrices ejemplares adicionales incluyen, por ejemplo, gel de fibrina, alginato, microtransportadores de sulfonato sódico de poliestireno, microtransportadores de dextrano recubiertos con colágeno, copolímeros de PLA/PGA y PHEMA/MMA (con proporciones de polímero que varían de 1-100 % para cada copolímero). De acuerdo con una realización preferida, estas matrices adicionales se modifican para incluir factores de unión o péptidos de adhesión, como se ha indicado y descrito anteriormente. Los factores de unión ejemplares incluyen, por ejemplo, gelatina, colágeno, fibronectina, gel de fibrina y ligandos de adhesión celular unidos covalentemente (incluyendo RGD) utilizando química de carbodiimida acuosa convencional. Los ligandos de adhesión celular adicional incluyen péptidos que tienen secuencias de reconocimiento de adhesión celular, incluyendo, pero sin limitación: RGDY, REDVY, GRGDF, GPDSGR, GRGDY y REDV.

De acuerdo con otra realización, el material de matriz biocompatible se modifica físicamente para mejorar la unión de las células a la matriz. De acuerdo con una realización, la matriz se reticula para potenciar sus propiedades mecánicas y para mejorar sus propiedades de unión y crecimiento celular. De acuerdo con una realización preferida, primero se reticula una matriz de alginato usando sulfato de calcio seguido de una segunda etapa de reticulación usando cloruro de calcio y protocolos rutinarios.

De acuerdo con otra realización más, se modifica el tamaño de poro de la matriz biocompatible. Un tamaño de poro de matriz preferido es de 25 µm a 100 µm; preferentemente de 25 µm a 50 µm; más preferentemente de 50 µm a 75 µm; incluso más preferentemente de 75 µm a 100 µm. Otros tamaños de poro preferidos incluyen tamaños de poro por debajo de 25 µm y por encima de 100 µm. De acuerdo con una realización, el tamaño de poro se modifica usando una técnica de lixiviación salina. El cloruro de sodio se mezcla en una solución del material de matriz y un disolvente, la solución se vierte en un molde y se deja que el disolvente se evapore. El bloque matriz/sal se sumerge después en agua y la sal lixiviada sale dejando una estructura porosa. El disolvente se selecciona de tal manera que la matriz está en la solución pero la sal no. Una solución ejemplar incluye PLA y cloruro de metileno.

De acuerdo con una realización alternativa, se incorporan burbujas de dióxido de carbono gaseoso en una forma no sólida de la matriz y después se estabiliza con un tensioactivo apropiado. Las burbujas de gas se retiran posteriormente usando un vacío, dejando una estructura porosa.

5 De acuerdo con otra realización, la técnica de secado por congelación se emplea para controlar el tamaño de poro de la matriz usando la velocidad de congelación de las micropartículas de hielo para formar poros de diferentes tamaños. Por ejemplo, una solución de gelatina del 0,1-2 % de gelatina porcina o bovina puede verse en un molde o en una placa y pre congelarse a diversas temperaturas diferentes y después liofilizarse durante un periodo de tiempo. Después, el material puede reticularse usando, preferentemente, luz ultravioleta (254 nm) o añadiendo  
10 glutaraldehído (formaldehído). Las variaciones en la temperatura de pre congelación (por ejemplo -20 °C, -80 °C o -180 °C), temperatura de liofilización (secado por congelación a -50 °C), y concentración de gelatina (0,1 % a 2,0 %; el tamaño de poro son generalmente inversamente proporcionales a la concentración de gelatina en la solución) pueden afectar al tamaño de poro resultante del material de la matriz y puede modificarse para crear un material preferido. El experto en la materia apreciará que un tamaño de poro adecuado es aquel que promueve y sostiene  
15 poblaciones celulares óptimas que tienen los fenotipos descritos en cualquier parte del presente documento.

Forma plana Flexible. Como se indica en el presente documento, las formas planas de matriz biocompatible pueden configurarse en una variedad de formas y tamaños, preferentemente, una forma y tamaño que se adopta para el implante en, adyacente o próximo a una fístula, injerto, injerto periférico u otra estructura de acceso vascular y sus entornos en los que puede conformarse en las superficies perfiladas de la estructura de acceso y sus vasos sanguíneos asociados. De acuerdo con una realización preferida, una sola pieza de matriz se dimensiona y configura para la aplicación en la estructura de acceso vascular específico a tratar.

De acuerdo con una realización, la matriz biocompatible se configura como una forma plana flexible. Una realización ejemplar configurada para administración en una estructura tubular tal como pero sin limitación para un vaso sanguíneo o para la administración a una estructura de acceso vascular tal como pero sin limitación una anastomosis vascular se ilustra en la FIG. 1. Las características de longitud, anchura, grosor y área de superficie no se representan a escala, o de una manera proporcionada en la FIG.1; la FIG. 1 es una realización ilustrativa no limitante.

Con referencia a la FIG. 1, una forma plana flexible 20 se forma a partir de una pieza de matriz biocompatible adecuado. Todo lo que se requiere es que la forma plana flexible 20 sea flexible, conformable y/o adaptable a una superficie exterior perfilada de una estructura tubular tal como un vaso sanguíneo. La forma plana flexible 20 puede ponerse en contacto con una superficie exterior de un vaso sanguíneo, puede envolver una estructura exterior o puede envolverse alrededor de una superficie exterior.

De acuerdo con una realización ejemplar ilustrada en la FIG. 2A, la forma plana flexible perfilada 20' puede configurarse para contener regiones definibles tal como un cuerpo 30, conectado a un puente 50, conectado a una lengüeta 40. La lengüeta 40 se separa del cuerpo 30 mediante el puente 50, aunque las diversas regiones forman un todo contiguo, de acuerdo con una realización ejemplar, los bordes interiores de estas varias regiones se disponen para definir una ranura interior 60 en la forma plana flexible perfilada 20'. De acuerdo con una realización preferida, estas regiones varias que definen la ranura interior 60 definen adicionalmente un primer punto de terminación 62 dentro del interior de una forma plana flexible perfilada 20', un segundo punto de terminación 64 en un borde exterior de la forma plana flexible perfilada 20' y una anchura 66. En esta realización particular ejemplar, el primer punto de terminación 62 está en un límite entre la lengüeta 40 y el puente 50; y el segundo punto de terminación 64 está en un límite entre la lengüeta 40 y el cuerpo 30.

En determinadas realizaciones, se contempla que la anchura 66 de la ranura 60 definida por lengüeta 40, cuerpo 30 y puente 50 definidos anteriormente es preferentemente de 0,025 a 0,10, más preferentemente de 0,12 a 0,20, más preferentemente de 0,15 centímetros. Preferentemente, la anchura 66 de la ranura 60 de la forma plana flexible 20' es de dimensión suficiente para disuadir a las células injertadas de que formen una capa confluyente ininterrumpida o un puente celular a través de la anchura 66 de la ranura 60. Sin embargo se contempla que las realizaciones que definen una ranura 60 y un ancho de ranura 66 pueden usarse como se describe en el presente documento e incluso si la anchura de separación de las células 66 por simple corte o de otra manera interrumpida tal como una capa de células o puente celular.

La presente invención contempla adicionalmente que la forma plana flexible 20' de la FIG. 1 pueda adaptarse para definir una ranura 60 inmediatamente antes de su uso simplemente mediante instrucciones al médico tratante experto para el uso de un escarpelo u otra herramienta de corte para cortar la forma plana, en parte, definiendo de ese modo una ranura.

En parte, la invención divulgada en el presente documento se basa en el descubrimiento de que una forma plana flexible perfilada y/o conformable permite que el material implantable se aplique óptimamente a una estructura tubular sin comprometer la integridad del implante o las células injertadas en el mismo. Una realización preferida optimiza el contacto con y está conforme con la anatomía de un vaso tratado quirúrgicamente y controla el grado de solapamiento del material implantable. Un exceso de solapamiento de material implantable en el espacio adventicio

puede causar puntos de presión sobre el vaso tratado, restringiendo potencialmente el flujo sanguíneo a través de los vasos o creando otras alteraciones que podrían retardar y/o inhibir la homeostasis y la curación normal. El médico practicante reconocerá el solapamiento excesivo en el momento del implante y reconocerá la necesidad de la reposición o modificación por ejemplo, de cortar el material implantable. Adicionalmente, en otras realizaciones, el solapamiento de material implantable puede dar como resultado una sobredosificación de agentes terapéuticos dispersos dentro del material implantable. Como se describe en cualquier parte del presente documento, los agentes químicos u otros agentes terapéuticos exógenamente proporcionados pueden añadirse opcionalmente a un implante. En determinadas otras realizaciones, dichos agentes pueden añadirse a una matriz biocompatible y administrarse en ausencia de células; se usa una matriz biocompatible de esta manera que opcionalmente define una ranura.

Por otro lado, el material implantable que no está adecuadamente en contacto con la estructura tubular diana puede conducir a una exposición insuficiente para los beneficios clínicos proporcionados por las células injertadas o una infradosificación del agente terapéutico añadido al material implantable. El experto habitual reconocerá que el contacto subóptimo en el momento del implante requiere el reposicionamiento y/o un material implantable adicional.

Composición Fluida. En determinadas realizaciones contempladas en el presente documento, el material implantable de la presente invención es una composición fluida que comprende una matriz biocompatible particulada. Cualquier composición fluida no sólida para su uso con un dispositivo de administración de tipo inyectable capaz de administración intraluminal (endovascular) navegando en la longitud interior de un vaso sanguíneo o por administración local percutánea se contempla en el presente documento. La composición fluida es preferentemente una composición que mantiene la forma. Por tanto, un material implantable que comprende células en, sobre o dentro de una matriz de partícula de tipo fluida como se contempla en el presente documento puede formularse para su uso con cualquier dispositivo de administración inyectable que varía en un diámetro interno de 22 calibre a 26 calibre y capaz de administrar 50 mg de composición fluida que comprende material particulado que contienen preferentemente aproximadamente 1 millón de células en 1 a 3 ml.

De acuerdo con una realización actualmente preferida, la composición fluida comprende una matriz particulada biocompatible tal como partículas de Gelfoam<sup>®</sup>, polvo Gelfoam<sup>®</sup>, o Gelfoam<sup>®</sup> pulverizado (Pfizer Inc., Nueva York, NY) (en lo sucesivo en el presente documento "partículas Gelfoam"), un producto procedente de gelatina dérmica porcina. De acuerdo con otra realización, la matriz particulada son microtransportadores de Cytodex-3 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), que comprenden colágeno desnaturalizado acoplado a una matriz de dextrano reticulado.

De acuerdo con realizaciones alternativas, la matriz particulada implantable biocompatible es una matriz biocompatible modificada. Las modificaciones incluyen las descritas anteriormente para un material de matriz implantable.

Siembra de Células de Matriz Biocompatible. Las piezas previamente cortadas de una matriz biocompatible adecuada o una alícuota de una matriz fluida biocompatible adecuada se rehidratan por la adición de EGM-2 sin antibióticos a aproximadamente 37 °C y con CO<sub>2</sub> al 5 % / aire 95 % durante 12 a 24 horas. El material implantable se retira después para su rehidratación a envases y se coloca en discos de cultivo de tejido individual. La matriz biocompatible se siembra a una densidad preferida de aproximadamente 1,5-2,0 x 10<sup>5</sup> células (1,25-1,66 x 10<sup>5</sup> células /cm<sup>3</sup> de matriz) y se coloca en una incubadora mantenida a una temperatura de aproximadamente 37 °C y CO<sub>2</sub> 5 % / aire 95 %, humedad 90 % durante 3-4 horas para facilitar la unión celular. La matriz sembrada se coloca después en tubos de envases individuales (American Master Tech, Lodi, CA), cada uno ajustado con una tapa que contiene un filtro de 0,2 µm con EGM-2 y se incuba a una temperatura de aproximadamente 37 °C y CO<sub>2</sub> 5 % / aire 95 %. El medio se cambia cada dos a tres días, después de esto, hasta que las células han alcanzado la confluencia. En una realización preferida las células se pasan preferentemente 6 veces, pero las células de pases menores o más pueden usarse.

Curva de Crecimiento Celular y Confluencia. Una muestra de material implantable se retira sobre o aproximadamente de 3 o 4, 6 o 7, 9 o 10 y 12 o 13, las células se cuentan y se evalúa la viabilidad y la curva de crecimiento se construye y se evalúa para evaluar las características del crecimiento y determinar si la confluencia, casi confluencia o postconfluencia se ha conseguido. Las curvas de crecimiento representativas de dos preparaciones de material implantable que comprenden lotes implantados de células endoteliales aórticas porcinas se presentan en las FIGS. 3A y 3B. En estos ejemplos, el material implantable es una forma plana flexible. Generalmente, un experto habitual en la técnica apreciará los indicios de medio celular aceptable en puntos tempranos medios y tardíos, tal como se observa mediante un aumento en el número de células en los momentos tempranos (cuando se refiere a la FIGURA 3A, entre los días 2-6), seguido de un pase de casi confluencia (en lo que se refiere a la FIGURA 3A, entre los días 6-8), seguido por una meseta en el número celular una vez que las células han alcanzado la confluencia (cuando se hace referencia en la FIGURA 3A, entre los días 8-10) y mantenimiento del número de células cuando las células están en postconfluencia (cuando se refiere a la FIGURA 3A, entre días 10-14). Para los fines de la presente invención, las poblaciones celulares que están en una meseta durante al menos 72 horas se prefieren.



Los recuentos celulares se realizan mediante digestión completa de la alícuota del material implantable con una solución de colagenasa 0,8 mg/ml en una solución de tripsina-EDTA. Después de medir el volumen del material implantable digerido, se diluye un volumen conocido de la suspensión celular con azul de tripano al 0,4 % (células 4:1 con respecto a azul de tripano) y se evalúa la viabilidad por exclusión con azul de tripano. Las células viables, no viables y totales se enumeran usando un hemocitómetro. Las curvas de crecimiento se construyen representando un número de células viables frente al número de días de cultivo. Las células se envían y se implantan después de alcanzar la confluencia.

Para los fines de la presente invención, la confluencia se define como la presencia de al menos  $4 \times 10^5$  células/cm<sup>3</sup> cuando en una forma plana flexible del material implantable (1,0 x 4,0 x 0,3 cm), y preferentemente  $7 \times 10^5$  a  $1 \times 10^6$  células totales por alícuota (50-70 mg) cuando está en la composición flexible. Para ambas, la viabilidad celular es al menos 90 % preferentemente pero no menor que el 80 %. Si las células no están en confluencia los días 12 o 13, los medios se cambian y la incubación continúa durante un día más. Este proceso continua hasta conseguir la confluencia o hasta 14 días después de la siembra. El día 14, si las células no han alcanzado la confluencia, el lote se desecha. Si se determina que las células están en confluencia después de realizar comprobaciones en proceso, se realiza un cambio de medio final. El cambio de medio final realizado usando rojo fenol sin EGM-2 y sin antibióticos. Inmediatamente después el medio se cambia, los tubos se ajustan con tapas herméticas de tapón estéril para su envío.

Evaluación de Funcionalidad. Para los fines de la invención descritos en el presente documento, el material implantable se ensaya adicionalmente para con respecto a los indicios de funcionalidad antes del implante. Por ejemplo, se recoge medio condicionado durante el período de cultivo para determinar niveles heparán sulfato, factor- $\beta_1$  de crecimiento transformante (TGF- $\beta_1$ ), factor de crecimiento de fibroblastos básico (b-FGF), y óxido nítrico que producen las células endoteliales cultivadas. En determinadas realizaciones preferidas, el material implantable puede usarse para los fines descritos en el presente documento cuando el número de células totales es de al menos aproximadamente 2, preferentemente al menos  $4 \times 10^5$  células/cm<sup>3</sup> de la forma plana flexible; el porcentaje de células viables es al menos el 80-90 %, preferentemente  $\geq 90$  %, más preferentemente al menos 90 %; el heparán sulfato en medio condicionado es al menos 0,5-1,0, preferentemente al menos 1,0 microg/10<sup>6</sup> células/día. El TGF- $\beta_1$  en medio condicionado es al menos 200-300, preferentemente al menos 300 picog/ml/día; el b-FGF en medio condicionado está por debajo de 200 picog/ml, preferentemente no más de 400 picog/ml.

Los niveles de heparán sulfato pueden cuantificarse usando un ensayo espectrofotométrico de digestión con ABC de condroitinasa de azul de dimetilmetileno rutinario. Los niveles de glucosaminoglucano (GAG) sulfatado se determinan usando un ensayo de unión al colorante de azul de dimetilmetileno (DMB) en el cual muestras desconocidas se comparan con una curva patrón generada usando cantidades conocidas de condroitín sulfato purificado diluido en medios de recogida. Muestras adicionales de medio condicionado se mezclan con ABC condroitinasa para digerir la condroitina y los dermatán sulfatos antes de la adición del reactivo de color DMB. Todas las absorbancias se determinan a la absorbancia de longitud de onda máxima del colorante DMB mezclado con el parón de GAG, generalmente de aproximadamente 515-525 nm. La concentración del heparán sulfato por 10<sup>6</sup> células por día se calcula restando la concentración de condroitín y dermatán sulfato a la concentración de glucosaminoglucano sulfatado total en las muestras de medio condicionado. La actividad de ABC condroitinasa se confirma digiriendo una muestra de condroitín sulfato purificado. Las muestras de medio condicionado se corrigen apropiadamente si se digiere menos del 100 % del condroitín sulfato purificado. Los niveles de heparán sulfato también pueden cuantificarse usando un ensayo ELISA que emplea anticuerpos monoclonales.

Los niveles de TGF- $\beta_1$  y b-FGF pueden cuantificarse usando un ensayo de ELISA que emplea anticuerpos monoclonales o policlonales, preferentemente policlonales. Los medios de recogida de control también pueden cuantificarse usando un ensayo ELISA y las muestras corregirse apropiadamente para los niveles de TGF- $\beta_1$  y b-FGF presentes en los medios de control.

Los niveles de óxido nítrico (NO) se pueden cuantificarse usando un ensayo de Reacción de Griess convencional. La naturaleza transitoria y volátil del óxido nítrico lo hace inadecuado para la mayoría de los métodos de detección. Sin embargo, pueden detectarse dos productos de degradación estable de óxido nítrico, nitrato (NO<sub>3</sub>) y nitrito (NO<sub>2</sub>), usando métodos fotométricos rutinarios. El ensayo de Reacción de Griess convierte enzimáticamente el nitrato en nitrito en presencia de nitrato reductasa. El nitrito se detecta colorimétricamente como un producto colorante azo de color, que absorbe luz visible en el intervalo de aproximadamente 540 nm. El nivel de óxido nítrico presente en el sistema se determina convirtiendo todo el nitrato en nitrito, determinando la concentración total de nitrito en las muestras desconocidas, y después comparando la concentración resultante de nitrito con una curva patrón generada usando cantidades conocidas de nitrato convertido a nitrito.

El fenotipo inhibitor preferido descrito anteriormente se evalúa usando ensayos cuantitativos de heparán sulfato, TGF- $\beta_1$ , NO y/o b-FGF descritos anteriormente, así como ensayos cuantitativos *in vitro* de células de la musculatura lisa que crecen y la inhibición de trombosis de la siguiente manera. Para los fines de la presente invención, el material implantable estará listo para su implante cuando uno o más de estos ensayos *in vitro* alternativos confirmen que el material implantable presenta el fenotipo inhibitor preferido.

Para evaluar la inhibición del crecimiento de las células de la musculatura lisa *in vitro*, se determina la magnitud de la inhibición asociada con las células endoteliales cultivadas. Las células de la musculatura lisa aórtica humana o porcina se siembran en placas de cultivo tisular de 24 pocillos en medio de crecimiento de células de la musculatura lisa (SmGM-2, Cambrex Bio Science). Se deja que las células se unan durante 24 horas. Después, el medio se reemplaza con medio basal de células de musculatura lisa (SmBM) que contiene FBS al 0,2 % durante 48-72 horas para detener el crecimiento de las células. Los medios acondicionados se preparan a partir de cultivos de células endoteliales post-confluentes, diluidos 1:1 con medio de cultivo SMC 2X y añadido a los cultivos. Se incluye un control positivo para la inhibición del crecimiento de células de la musculatura lisa en cada ensayo. Después de tres o cuatro días, el número de células en cada muestra se enumera usando un contador de Coulter. El efecto del medio condicionado sobre la proliferación de células de la musculatura lisa se determina comparando el número de células de musculatura lisa por pocillo inmediatamente antes de la adición de medio condicionado con de después de tres a cuatro días de exposición con el medio condicionado, y con los medios de control (medio de cultivo convencional con y sin la adición de factores de crecimiento). La magnitud de la inhibición asociada con las muestras de medio condicionado se compara con la magnitud de inhibición asociada con el control positivo. De acuerdo con una realización preferida, el material implantable se considera inhibidor si el medio condicionado inhibe el 20 % de lo que el control de heparina es capaz de inhibir.

Para evaluar la inhibición de la trombosis *in vitro*, se determina el nivel de heparán sulfato asociado con las células endoteliales cultivadas. El heparán sulfato tiene propiedades tanto anti-proliferativas como anti-trombóticas. Usando bien los ensayos espectrofotométricos de ABC condroitinasa con azul de dimetilmileno rutinarios o un ensayo ELISA, ambos ensayos se describen en detalle anteriormente, se calcula la concentración de heparán sulfato por  $10^6$  células. El material implantable puede usarse para los fines descritos en el presente documento cuando el heparán sulfato en el medio condicionado es al menos 0,5-1,0, preferentemente al menos 1,0 microg/ $10^6$  células/día.

Otro método para evaluar la inhibición de la trombosis implica determinar la magnitud de inhibición de la agregación plaquetaria *in vitro* asociada con plasma rico en plaquetas. El plasma porcino se obtiene por la adición de citrato sódico a muestras de sangre porcina a temperatura ambiente. El plasma citrado se centrifuga a una velocidad suave, para extraer los eritrocitos y leucocitos en un sedimento, dejando a las plaquetas suspendidas en el plasma. El medio condicionado se preparó a partir de cultivos de células endoteliales post-confluentes y se añadió a alícuotas del plasma rico en plaquetas. Se añade un agente de agregación plaquetaria (agonista) al plasma como control. Los agonistas plaquetarios normalmente incluyen araquidonato, ADP, colágeno, epinefrina, y ristocetina (disponible de Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO). Un alícuota de plasma adicional no tiene agonista plaquetario o medio condicionado añadido, para evaluar la agregación plaquetaria espontánea inicial. También se incluye en cada ensayo un control positivo para la inhibición de la agregación plaquetaria. Los controles positivos ejemplares incluyen aspirina, heparina, abciximab (ReoPro®, Eli Lilly, Indianapolis, IN), tirofiban (Aggrastat®, Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ) o eptifibatida (Integrilin®, Millennium Pharmaceuticals, Inc., Cambridge, MA). La agregación plaquetaria resultante de todas las condiciones de ensayo se mide después usando un agregómetro. El agregómetro mide la agregación plaquetaria controlando la densidad óptica. A medida que se agregan las plaquetas, más luz puede pasar a través del espécimen. Los informes del agregómetro dan como resultado "unidades de agregación plaquetaria", una función de la velocidad a la cual se agregan las plaquetas. La agregación se evalúa como agregación máxima a 6 minutos después de la adición del agonista. El efecto del medio condicionado sobre la agregación plaquetaria se determina comparando la agregación plaquetaria inicial antes de la adición de medio condicionado con la de la exposición posterior de plasma rico en plaquetas al medio condicionado, y con el control positivo. Los resultados se expresan como un porcentaje inicial. La magnitud de la inhibición asociada con las muestras de medio condicionado se compara con la magnitud de inhibición asociada con el control positivo. De acuerdo con una realización preferida, el material implantable se considera inhibidor si el medio condicionado inhibe aproximadamente el 20 % de lo que el control positivo es capaz de inhibir.

Cuando ya está listo para su implante, el material implantable que comprende una forma plana flexible se proporciona en envases de producto final, preferentemente conteniendo cada uno una pieza estéril de  $1 \times 4 \times 0,3$  cm ( $1,2$  cm<sup>3</sup>) con preferentemente  $5-8 \times 10^5$  preferentemente al menos  $4 \times 10^5$  células/cm<sup>3</sup> y al menos el 90 % de células viables, por ejemplo, células endoteliales aórticas humanas derivadas de una sola fuente de donante de cadáver, por centímetro cúbico en 45-60 ml, preferentemente 50 ml, medio de crecimiento endotelial (por ejemplo medio de crecimiento endotelial (EGM-2) que no contiene rojo fenol ni antibióticos. Cuando se usan células endoteliales aórticas porcinas, el medio de crecimiento es también EBM-2 que no contiene rojo fenol, pero está complementado con FBS al 5 % y gentamicina 50 µg/ml.

En otras realizaciones preferidas, el material implantable que comprende una forma particulada fluida se proporciona en envases de producto final, que incluyen, por ejemplo, envases de cultivo tisular sellados modificados con tapones de filtro o jeringas previamente cargadas, conteniendo cada una preferentemente 50-60 mg de material particulado injertado con  $7 \times 10^5$  a  $1 \times 10^6$  células endoteliales totales en 45-60 ml, preferentemente 50 ml, de medio de crecimiento endotelial por alícuota.

Vida Útil del Material Implantable. El material implantable que comprende una población de células confluentes, casi confluentes o post-confluentes puede mantenerse a temperatura ambiente en una condición estable y viable durante al menos dos semanas. Preferentemente, dicho material implantable se mantiene en 45-60 ml, más preferentemente

50 ml, de medios de transporte con o sin FBS adicional. Los medios de transporte comprenden medio EGM-2 sin rojo fenol. Puede añadirse FBS al volumen del medio de transporte hasta FBS al 10 % o una concentración total de FBS al 12 %. Sin embargo, debido a que el FBS debe retirarse del material implantable antes del implante, se prefiere limitar la cantidad de FBS usada en el medio de transporte para reducir la duración de lavado necesario antes del implante.

Crioconservación del Material Implantable. El material implantable confluyente que comprende una población de células confluentes puede crioconservarse para el almacenamiento y/o transporte al centro clínico sin disminuir su fuerza o integridad clínica después del descongelado eventual. Preferentemente, el material implantable se crioconserva en un vial de criogenia de 15 ml (Nalgene®, Nalge Nunc Int'l, Rochester, NY) en una solución de aproximadamente 5 ml, solución CryoStor CS-10 (BioLife Solutions, Oswego, NY) que contiene DMSO del 5 % al 20 %, dextrano 2-8 % y FBS 50-75 %. Los viales de criogenia se colocan en un baño de agua fría con isopropanol (o con cualquier agente de este tipo que controle la velocidad de congelación), se transfirieron a un congelador a -80 °C durante 4 horas, y posteriormente se transfiriere a nitrógeno líquido (-150 a -165 °C).

Las alícuotas crioconservadas del material implantable se descongelan después lentamente a temperatura ambiente seguida de 15 minutos adicionales en un baño con agua a temperatura ambiente. Después, el material se lava 3 veces en 15 ml de medio de lavado. El medio de lavado comprende EBM sin rojo fenol y con 50 µg/ml de gentamicina. Los dos primeros métodos de aclarado se realizan durante 5 minutos a temperatura ambiente. El método de aclarado final se realiza durante 30 minutos a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 %.

Después de los métodos de descongelado y aclarado, el material crioconservado se deja en reposo durante 48 horas en 10 ml de solución de recuperación. Para las células endoteliales porcinas, la solución de recuperación es EBM-2 complementado con FBS al 5 % y 50 µg/ml de gentamicina a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 %. Para células endoteliales humanas, la solución de recuperación es EGM-2 sin antibióticos. Además, el acondicionado post-descongelación puede realizarse durante al menos otras 24 horas antes de usar y/o envasar para el almacenaje o transporte.

Inmediatamente antes del implante, el medio se decanta y el material implantable se aclara en solución salina (USP) 250-500 ml. El medio en el producto final contiene una pequeña cantidad de FBS para mantener la viabilidad celular durante el transporte a un lugar del centro médico si fuera necesario. El FBS se ha ensayado exhaustivamente con respecto a la presencia de bacterias, hongos y otros agentes virales de acuerdo con el Título 9 CFR: Animales y Productos Animales. Se emplea un procedimiento de aclarado justo antes del implante, que disminuye la cantidad de FBS transferido preferentemente a entre 0-60 ng por implante.

La carga de células totales por paciente humano será preferentemente de 1,6-2,6 x 10<sup>4</sup> células por kg de peso corporal, pero no menor de 2 x 10<sup>3</sup> y no más de 2 x 10<sup>6</sup> células por kg de peso corporal.

Como se contempla en el presente documento, el material implantable de la presente invención comprende células, preferentemente células endoteliales vasculares, que son preferentemente viables al 90 %, a una densidad de preferentemente 4 x 10<sup>5</sup> células/cm<sup>3</sup> de forma plana flexible, y cuando son confluentes, producen medio condicionado que contiene heparán sulfato a al menos 0,5-1,0, preferentemente al menos 1,0 microg/10<sup>6</sup> células/día, TGF-β1 a al menos 200-300, preferentemente al menos 300 picog/ml/día, y b-FGF por debajo de al menos 210 picog/ml, preferentemente no más de 400 picog/ml.

#### Aplicación del material implantable en forma plana flexible

Consideración general. El material implantable puede administrarse a una estructura de acceso vascular de diversas formas. De acuerdo con una realización preferida, el material implantable es una forma plana flexible cortada en una forma y tamaño que se adapta para la implantación adyacente a una fístula, injerto, injerto periférico, u otra estructura de acceso vascular y sus entornos y que puede conformarse con las superficies perfiladas de la estructura de acceso y está asociada a vasos sanguíneos.

De acuerdo con una realización preferida, una sola pieza de material implantable se conforma para aplicación en la estructura de acceso vascular a tratar. De acuerdo con otra realización, puede aplicarse más de una pieza de material implantable en su forma plana flexible, por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más piezas de material de matriz, a una localización de acceso vascular sencilla. Adicionalmente, puede tratarse más de una localización a lo largo de la longitud de una estructura de acceso vascular con una o más piezas del material implantable. Por ejemplo, en el caso de un injerto arteriovenoso, cada una de las anastomosis venosas proximales, anastomosis venosas distales y secciones venosas distales pueden tratarse con una o más piezas del material de matriz implantable.

De acuerdo con una realización no limitante, el material implantable se configura para conformarse con una superficie exterior de un vaso sanguíneo. Una forma plana no limitante ejemplar se ilustra en la FIG. 1. Con referencia a la FIG. 1, la forma plana flexible 20 ejemplar tiene una longitud 12, una anchura 14 y una altura 16. De acuerdo con una realización preferida, la longitud 12 de la forma plana flexible 20 es de 2 cm a 6 cm, la anchura 14 de la plana flexible 20 es 0,5 cm a 2 cm, y la altura 16 de la forma plana flexible 20 es de 0,1 cm a 0,5 cm.

De acuerdo con otra realización, la forma plana flexible 20 puede configurarse como una forma anatómicamente perfilada que se conforma con una superficie exterior de un vaso sanguíneo o una estructura de acceso vascular. Una forma plana flexible perfilada 20' anatómicamente ejemplar configurada para la administración a una estructura de acceso vascular se representa en la FIG. 2A y se explica con detalle más adelante.

5 Como se explica en cualquier parte del presente documento, la forma plana flexible perfilada 20' de la FIG. 2A puede configurarse de diversas formas geométricas. Por ejemplo, de acuerdo con una realización, la forma plana flexible perfilada 20' contiene diversas regiones que definen una ranura interior 60. De acuerdo con realizaciones adicionales los bordes de la forma flexible plana perfilada 20' y o de la ranura inferior 60 están en forma de ángulo curvada. De acuerdo con otra realización, la altura 16' de la forma plana flexible perfilada 20' varía a lo largo de la longitud 12' y/o anchura 14'. Adicionalmente, puede haber una o más de una lengüeta 40, puente 50 y/o ranura 60, dependiendo de la configuración y del propósito deseado de la forma plana flexible perfilada 20'. Con respecto a la característica de una ranura, una ranura puede definirse en cualquier lugar en, o sobre o dentro de la forma plana flexible perfilada 20'. Una ranura puede definirse para que sea uniforme en cuanto a la anchura o variar de anchura. Una ranura puede definirse como lineal, no lineal o curvada.

20 Con referencia a las FIGS. 2B, 2C, 2D y 2E, que representan múltiples realizaciones de la forma plana flexible perfilada 20' de la presente invención que contiene al menos una ranura 60, la forma plana flexible perfilada 20' puede definir una o más de una ranura en determinadas realizaciones y puede usarse de acuerdo con los métodos divulgados en el presente documento. La ranura 60 definida sobre o dentro de una forma plana flexible perfilada 20' puede alinearse a lo largo de cualquier borde de la forma plana flexible perfilada 20' o puede introducirse en el interior de la forma perfilada 20'. En referencia ahora a la FIG. 2E, la anchura 66 o la forma total de la ranura 60 en o dentro de la forma plana flexible perfilada 20' puede definirse para que sea uniforme en cuanto a anchura o modificar su anchura y puede definirse como lineal, no lineal o curvada.

25 Con referencia a las FIGS. 2F y 2G, la forma plana flexible perfilada 20' puede definir una ranura 60 o 60' que tiene diferentes anchuras 66 y 66', respectivamente.

30 Como se representa, la ranura 60' de la FIG. 2G y la anchura 66' son representativas de una realización en la que el médico tratante, en el momento del implante, corta la forma plana flexible 20' como se lleva en cualquier parte del presente documento, convirtiéndola de este modo en la forma plana flexible perfilada 20' representada en la FIG. 2G.

35 De acuerdo con una realización, un extremo en la conexión anastomótica vascular lateral, tal como una fístula arteriovenosa, puede tratarse usando el material implantable de la invención. Las etapas de un método ejemplar para aplicar el material implantable en una forma plana flexible a una anastomosis vascular lateroterminal se ilustran en las FIGS. 4A, 4B y 4C.

40 Con referencia a la FIG. 4A, se proporciona una primera pieza de material implantable 22 a la estructura de acceso vascular pasando un extremo 34, o un segundo extremo 36 de la primera pieza del material implantable 22 bajo un segmento anastomótico 110 hasta que el centro 32 de la primera pieza del material implantable 22 está en una unión 112 en la que los vasos 100, 110 se encuentran. Los extremos 34, 36 se envuelven después alrededor de una línea de sutura 114 en la unión 112, manteniendo el material implantable en el centro sobre la línea de sutura 114. De acuerdo con una realización, los extremos 34, 36 de la primera pieza del material de matriz implantable 22 pueden solapar entre sí lo suficientemente solo para garantizar que la primera pieza del material de matriz implantable 22 está en su sitio. De acuerdo con otra realización, los extremos 34, 36 de la primera pieza del material de matriz implantable 22 no se solapan entre sí. Los extremos 34, 36 de la primera pieza del material de matriz implantable 22, o de cualquier otra pieza del material de matriz implantable, no tienen que ajustarse entre sí, solaparse entre sí, o envolverse alrededor de toda la circunferencia de cualquier vaso 100, 110. De acuerdo con una realización preferida, los extremos 34, 36 de la primera pieza del material implantable se envuelven hasta el grado en que sea posible alrededor de la unión anastomótica 112 sin estiramiento o desgarro. Todo lo que se requiere es que se consiga la cobertura adecuada del/los vaso(s). El experto en la materia apreciará cuándo se realiza la administración del material implantable de manera correcta.

55 Con referencia a la FIG. 4B, de acuerdo con otra realización, una segunda pieza de material implantable 24 se aplica opcionalmente, con el centro 42 de la segunda pieza del material implantable 24 centrada a o adyacente o en proximidad de la unión anastomótica 112. Los extremos 44, 46 de la segunda pieza del material implantable 24 se envuelven alrededor del vaso 100. Como se describe con respecto a la primera pieza del material implantable 22 en la FIG. 4A, puede que los extremos 44, 46 de la segunda pieza del material de matriz implantable 24, pero no se requiere, se toquen, se solapen o se envuelvan alrededor de toda la circunferencia de cualquier vaso 100, 110.

60 Con referencia a la FIG. 4C, de acuerdo con otra realización más, una tercera pieza de material implantable 26 se coloca opcionalmente en el segmento del vaso proximal 116 del vaso tratado 100, distal a la unión anastomótica 112. La tercera pieza del material implantable 26, de acuerdo con una realización, se coloca longitudinalmente a lo largo de la longitud del vaso 100 con un primer extremo 54 de la tercera pieza de material implantable 26 a, adyacente a o en la proximidad de la unión anastomótica 112 y un segundo extremo 56 de la tercera pieza de

material implantable 26 distal a la unión anastomótica 112. Como se describe con respecto a la primera pieza de material implantable 22 en la FIG. 4A, los extremos 54, 56 de la tercera pieza de material de matriz implantable 26 pueden, pero no se requiere que, se toquen, se solapen o se envuelvan alrededor de toda la circunferencia del vaso 100.

5 De acuerdo con una realización alternativa, una sola pieza de la forma plana flexible perfilada 20' que define una ranura 60, por ejemplo la forma perfilada ejemplar ilustrada en la FIG. 2A, se proporciona a una estructura de acceso vascular, por ejemplo, en una anastomosis lateroterminal. El implante de la forma plana flexible perfilada 20' del material implantable que define la ranura 60, adyacente o en la proximidad de una anastomosis lateroterminal se ilustra en la FIG. 5. Cuando el material implantable se usa a modo de envoltura, se contempla que una sola pieza de material de matriz implantable sea adecuada para tratar tanto la anastomosis como la vasculatura adyacente. Cada forma plana flexible perfilada 20' se dimensiona y se conforma para su aplicación a una estructura de acceso vascular particular y, por lo tanto, se preforma para proporcionar una cobertura adecuada y un nivel suficiente de factores de células endoteliales y/o agente(s) terapéutico(s) para crear un entorno homeostático para esa estructura de acceso vascular particular y la vasculatura adyacente.

20 Con referencia a la FIG. 5, de acuerdo con una realización, se proporciona un solo perfil 20' que define una ranura con una anastomosis separando el cuerpo 30 de la lengüeta 40. El cuerpo 30 se coloca a lo largo de una superficie de vaso primario 100. El puente 50 se coloca sobre una superficie de vaso primario 100 y bajo la rama de un vaso secundario 110. La lengüeta 40 después se lleva alrededor del vaso ramificado 110 y la lengüeta 40 se coloca a lo largo de una superficie superior del vaso ramificado 110.

25 De acuerdo con la FIG. 5, la única pieza de forma plana flexible perfilada 20' contiene dos puntos de referencia 70, 80 (véase la FIG. 2A). Cuando se administra al sitio de una anastomosis lateroterminal, como se ilustra en la FIG. 5, los dos puntos de referencia 70, 80 se alinean. El primer punto de referencia 70 se localiza en la lengüeta 40 y el segundo punto de referencia 80 se localiza en el puente 50 (véase también la FIG. 2A). En una realización de la forma plana flexible perfilada 20', los puntos de referencia 70, 80 antes del implante se separan por una distancia de aproximadamente 1,27 centímetros, preferentemente menos de aproximadamente 2,54 centímetros más preferentemente aproximadamente 2,54 centímetros y más preferentemente no más de 3,81 centímetros. Cuando forma plana flexible perfilada 20' se administra al sitio de una anastomosis, la rotación de la forma plana flexible perfilada 20' alrededor del vaso ramificado 110 permitida por la característica de ranura hace que los puntos de referencia 70, 80 se alineen.

35 De acuerdo con una realización (y en referencia de nuevo a las FIGS. 4A, 4B y 4C), por ejemplo, cuando se trata un injerto arteriovenoso, la primera pieza de material implantable 22 y la segunda pieza de material implantable 24 se aplican a cada una de las anastomosis venosas proximales y anastomosis venosas distales. Adicionalmente, la tercera pieza del material implantable 26 puede colocarse en la vena distal, aguas abajo de la anastomosis venosa distal.

40 De acuerdo con otra realización alternativa ejemplar ilustrada en la FIG. 6, una sola pieza de material implantable en forma plana flexible 20 se aplica a una estructura tubular tal como un vaso 100. Se contempla que el material implantable pueda aplicarse a una estructura tubular tal como un vaso que no contiene una estructura de acceso vascular. Por ejemplo, una parte venosa aguas abajo de una estructura de acceso vascular puede experimentar inflamación aumentada, trombosis, reestenosis u oclusión resultante de una formación de estructura de acceso vascular o de agujas hipodérmicas en la estructura de acceso vascular, aguas arriba de la parte venosa tratada. En dicho caso, el material implantable de la presente invención puede tratar, controlar y/o mejorar estas condiciones que surgen a una distancia de la estructura de acceso vascular.

#### 50 Aplicación del material implantable en una composición fluida

Consideraciones Generales. El material implantable de la presente invención cuando se encuentra en una composición fluida comprende una matriz biocompatible particulada y células, preferentemente endoteliales, más preferentemente células endoteliales vasculares, que son aproximadamente viables al 90 % a una densidad preferida de  $0,8 \times 10^4$  células/mg, más preferentemente de  $1,5 \times 10^4$  células/mg, más preferentemente de  $2 \times 10^4$  células/mg y que pueden introducir medios condicionados que contienen heparán sulfato a al menos 0,5-1,0, preferentemente al menos 1,0 microg/ $10^6$  células/día, TGF- $\beta_1$  a al menos 200-300, preferentemente a al menos 300 picog/ml/día, y b-FGF por debajo de 200 picog/ml y preferentemente no más de 400 picog/ml; y, presenta el fenotipo inhibidor descrito anteriormente.

60 Para los fines de la presente invención generalmente, la administración del material particulado fluido se localiza en un sitio en, adyacente a o en las proximidades de la estructura de acceso vascular. El sitio de deposición del material implantable es extraluminal. Como se contempla en el presente documento, la deposición localizada, extraluminal puede realizarse de la siguiente manera.

65 En una realización particularmente preferida, la composición fluida se administra primero por vía percutánea, introduciéndose en un espacio prevascular y después depositándose en un sitio extraluminal usando una aguja,

catéter o cualquier otro dispositivo de aplicación de tipo inyección percutáneo adecuado. Como alternativa, la composición fluida se aplica por vía percutánea usando una aguja, catéter o cualquier dispositivo de aplicación adecuado junto con una etapa de identificación para facilitar la aplicación a un sitio extraluminal deseado. La etapa de identificación puede producirse antes o simultáneamente con la aplicación percutánea. La etapa de identificación puede realizarse usando metodologías de ultrasonido intravascular, otras metodologías de ultrasonido rutinarias, fluoroscopia y/o endoscopia, por nombrar unas pocas. La etapa de identificación se realiza opcionalmente y no se requiere la práctica de los métodos de la presente invención.

La composición fluida también puede administrarse por vía intraluminal, es decir, endovascular. Por ejemplo, la composición puede aplicarse mediante cualquier dispositivo capaz de insertarse dentro de un vaso sanguíneo. En este caso, dicho dispositivo de aplicación intraluminal está dotado de un dispositivo que atraviesa o penetra la pared luminal de un vaso sanguíneo para alcanzar una superficie no luminal de un vaso sanguíneo. La composición fluida se deposita después en una superficie no luminal de un vaso sanguíneo adyacente a, o en la proximidad de un sitio de estructura de acceso vascular.

En el presente documento se contempla que una superficie no luminal, también denominada extraluminal, pueda incluir una superficie exterior o perivascular de un vaso, o pueda estar dentro de la capa adventicia, media o íntima de un vaso sanguíneo. Para los fines esta invención, no luminal o extraluminal es cualquier superficie excepto una superficie interior del lumen.

Los dispositivos penetrantes contemplados en el presente documento pueden permitir, por ejemplo, un solo punto de aplicación o una pluralidad de puntos de aplicación dispuestos en una configuración geométrica deseada para realizar la aplicación de la composición fluida a una superficie no luminal de un vaso sanguíneo sin alterar una estructura de acceso vascular. Puede disponerse una pluralidad de puntos de aplicación, por ejemplo, en una disposición de matriz circular, en ojo de buey o lineal, por nombrar unas pocas. El dispositivo penetrante también puede estar en forma de un perforador de estent, tal como pero sin limitación, un estent con balón que incluya una pluralidad de puntos de aplicación.

De acuerdo con una realización preferida de la invención, el dispositivo penetrante se inserta mediante la superficie luminal interior del vaso sanguíneo proximal o distal al sitio de la estructura de acceso vascular. En algunos sujetos clínicos, la inserción del dispositivo penetrante en el sitio de la estructura de acceso vascular podría alterar la estructura de acceso vascular y/o dar como resultado la dehiscencia de un injerto arteriovenoso o periférico. Por consiguiente, en dichos sujetos, hay que tener cuidado al insertar el dispositivo penetrante en una localización a una distancia de la estructura de acceso vascular, preferentemente a una distancia determinada por el médico regulada por las circunstancias específicas en cuestión.

Preferentemente, la composición fluida se deposita en una superficie perivascular de un vaso sanguíneo, bien en el lado de una estructura de acceso vascular a tratar o adyacente a o en la proximidad del sitio de una estructura de acceso vascular. La composición puede depositarse en una variedad de localizaciones con respecto a una estructura de acceso vascular, por ejemplo, en la anastomosis proximal, en la anastomosis distal, adyacente a cualquier anastomosis, por ejemplo, aguas arriba de la anastomosis, en la superficie exterior del vaso opuesto a partir de la anastomosis. De acuerdo con una realización preferida, un sitio adyacente está dentro de aproximadamente 2 mm a 20 mm del sitio de la estructura de acceso vascular. En otra realización preferida, un sitio está dentro de aproximadamente 21 mm a 40 mm; en otra realización incluso preferida, un sitio está dentro de aproximadamente 41 mm a 60 mm. En otra realización preferida, un sitio está dentro de aproximadamente 61 mm a 100 mm. Como alternativa, un sitio adyacente es cualquier otra localización adyacente determinada por el médico en el que la composición depositada es capaz de mostrar un efecto deseado en un vaso sanguíneo en la proximidad de la estructura de acceso vascular.

En otra realización, la composición fluida se aplica directamente a un sitio extraluminal expuesto quirúrgicamente adyacente a o en o en la proximidad de la estructura de acceso vascular. En este caso la aplicación está guiada y dirigida por observación directa del sitio. También, en este caso, la aplicación puede ayudarse por el uso coincidente de una etapa de identificación como se ha descrito anteriormente. De nuevo, la etapa de identificación es opcional.

Administración extraluminal. Para los fines de la presente invención, la administración de una composición fluida se localiza en un sitio adyacente a, o próximo o en las cercanías de, o en un sitio donde se necesita el tratamiento. Como se contempla en el presente documento, la deposición localizada extraluminal puede realizarse de la siguiente manera.

La composición fluida se aplica por vía percutánea usando una aguja, un catéter u otro dispositivo de aplicación adecuado. Como alternativa, la composición fluida se aplica por vía subcutánea en coincidencia con el uso de un método de guía para facilitar la aplicación al sitio que necesita el tratamiento. Después de entrar en el espacio perivascular, el médico deposita la composición fluida en un sitio extraluminal, adyacente a o en la proximidad del sitio que necesita el tratamiento. La aplicación percutánea puede guiarse activamente y dirigirse mediante metodologías de ultrasonido, fluoroscópicas, endoscopias rutinarias, por nombrar unas cuantas.

En otra realización, la composición fluida se aplica localmente a un sitio extraluminal expuesto quirúrgicamente adyacente a o en la proximidad de un sitio que necesita el tratamiento. En este caso la aplicación está guiada y dirigida por observación directa del sitio que necesite el tratamiento; también en este caso, la aplicación puede estar ayudada por el uso coincidente de otros métodos de guía como se ha descrito anteriormente.

Sellador anastomótico. En determinadas otras realizaciones, la composición fluida de la presente invención puede servir adicionalmente como un sellador anastomótico específicamente o generalmente un sellador quirúrgico. En dicha realización de doble propósito, la composición es también eficaz para sellar la unión de dos o más estructuras tubulares o sellar un espacio en una estructura tubular cuando se pone en contacto con una superficie exterior de la(s) estructura(s), o aplicarse en un arco sobre una superficie exterior o aplicarse en una circunferencia. Dicho sellador puede eliminar una necesidad de suturas que pueden dañar adicionalmente el tejido vascular, por ejemplo, y contribuir a un traumatismo endotelial luminal. Dicho sellador también puede proporcionar estabilidad adicional en la proximidad de una anastomosis reforzando de este modo cualquier reparación de la sutura. Todo lo que se requiere es que las propiedades de tipo sellador de esta composición de doble finalidad no interfieran con u otorguen una expresión coincidente del fenotipo deseado de las células y la funcionalidad basada en células de la composición.

Para los fines de determinadas realizaciones selladoras, la composición fluida comprende una matriz biocompatible en sí misma, comprende un componente que tiene propiedades selladoras, tales como, pero sin limitación, una red de fibrina, aunque también tiene las propiedades necesarias para soportar poblaciones de células endotelial o de tipo endotelial. Además, por sí misma la matriz biocompatible puede tener propiedades selladoras así como las necesarias para soportar una población de células. En el caso de otras realizaciones, las células pueden contribuir al menos en parte a las propiedades selladoras. Por ejemplo, se contempla que las células asociadas con la composición produzcan una sustancia que pueda modificar un sustrato, de tal manera que el sustrato adquiere propiedades selladoras, al mismo tiempo que presenta/mantiene su requisito de funcionalidad celular. Determinadas células pueden producir esta sustancia naturalmente mientras que otras células pueden modificarse por ingeniería genética para que lo hagan.

#### Método de Preparación, Conservación y Transporte de Material Implantable

Métodos para Obtener y Preparar Células. El material implantable comprende células endoteliales o de tipo endotelial alogénicas, xenogénicas o autólogas. Las células endoteliales se obtienen de un paciente, un cadáver o un banco de células. Las células endoteliales proceden de tejido vascular, más preferentemente de tejido aórtico, más preferentemente de tejido de arteria coronaria, tejido de arteria pulmonar o tejido de arteria iliaca. Como alternativa, las células endoteliales o de tipo endotelial proceden de un tejido u órgano no vascular, células progenitoras endoteliales u otras células progenitoras o de células madre. De acuerdo con realizaciones adicionales, las células se alteran, modifican o diseñan por ingeniería genética.

Cada lote de células procedente de un donante se ensaya exhaustivamente con respecto a la pureza de las células endoteliales, función biológica, la presencia de micoplasma, bacterias, hongos, levaduras, agentes patógenos humanos conocidos u otros agentes accidentales. De acuerdo con una realización preferida, las células se obtienen de un donante con sangre de tipo O. Adicionalmente las células se expanden al pase 2 o 4, se caracterizan y se criopreservan a -140 °C para formar un banco de células maestro usando técnicas bien conocidas para preparación posterior de un banco celular de trabajo, expansión en cultivos y posterior formulación en el material implantable.

Después, un banco de células maestro seleccionado se expande para formar un banco de células de trabajo en un matraz T-75 que contiene 15 ml de medio de crecimiento de células endoteliales. Los matraces se colocan en una incubadora mantenida a una temperatura de aproximadamente 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> / 95 % de aire, 90 % de humedad durante un mínimo de 30 minutos. Uno o dos viales de células se sacan del congelador a -160 °C-140 °C y se descongelan a aproximadamente 37 °C. Cada vial de células descongeladas se siembra en dos matraces T-75 a una densidad de 3,0x10<sup>3</sup> células por cm<sup>3</sup>, preferentemente, pero no menos de 1,0x10<sup>3</sup> y no más de 7,0x10<sup>3</sup>. Los matraces que contienen las células vuelven a llevarse a la incubadora. Después de 8-24 horas, el medio consumido se retira y se reemplaza por medio reciente. Los medios se cambian cada dos o tres días, posteriormente, hasta que las células alcanzan una confluencia del 85-100 % preferentemente, pero no menor del 60 % y no mayor del 100 %. Cuando el material implantable está destinado a aplicación clínica, solamente se usa medio sin antibióticos en el cultivo postdescongelado de células y la fabricación de material implantable de la invención.

El medio de crecimiento endotelial se retira después y la monocapa de células se aclara con 10 ml de solución salina tamponada con HEPES (HEPES). El HEPES se retira, y se añaden 2 ml de tripsina (aproximadamente 0,25 mg/ml) para separar las células de la superficie de los matraces T-75. Una vez producida la separación, se añaden 3 ml de solución neutralizante de tripsina (TNS) para detener la reacción enzimática. Se añaden 5 ml más de HEPES y las células se enumeran usando un hemocitómetro. La suspensión celular se centrifuga y se ajusta a una densidad de 1,75 x 10<sup>6</sup> células/ml usando EGM-2 sin antibióticos.

Si las células van a congelarse para formar un banco de células de trabajo, el medio se complementa con un FBS al 10 % adicional (FBS al 12 % final) y dimetilsulfóxido (DMSO) al 10 %. Volúmenes de un mililitro de la suspensión

celular resultante se dispensan en viales de criogenia y se colocan en un congelador a -80 °C durante 4-24 horas. Las células congeladas, es decir, el banco de células de trabajo, se transfieren después a un congelador ajustado a -140 °C para la conservación hasta su uso. El banco de células de trabajo se congela en el paso 5.

5 Métodos para Preparar el Material Implantable. Las piezas previamente cortadas de una matriz biocompatible o una alícuota de matriz fluida se rehidratan añadiendo EGM-2 sin antibióticos a aproximadamente 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> al / 95 % de aire durante de 12 a 48 horas. El material de la matriz se retira después de este envase de rehidratación y se coloca en una placa de cultivo tisular individual. El material de matriz se siembra con células del banco de células de trabajo a una densidad preferida de aproximadamente 1,5-2,0 x 10<sup>5</sup> células (1,25-1,66 x 10<sup>5</sup> células/cm<sup>3</sup> de matriz) y se coloca en una incubadora mantenida a aproximadamente 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> / 95 % de aire, 90 % de humedad al durante 3-4 horas para facilitar la unión de las células. De acuerdo con una realización, la matriz sembrada se coloca después en un envase o tubo hermético individual, con una tapa ajustada que contiene un filtro de 0,2 µm con EGM-2 y se incuba a aproximadamente 37 °C y con 5 % de CO<sub>2</sub> / 95 % de aire. El medio se cambia cada dos o tres días, posteriormente, hasta que las células han alcanzado la confluencia. De acuerdo con una realización alternativa, la matriz sembrada se coloca en un envase o tubo hermético individual, equipado de un capuchón protector y se purga con CO<sub>2</sub> al 10 %. De acuerdo con este método, el envase se purga con CO<sub>2</sub> al 10 % en cada cambio de medio.

20 Métodos de Determinación de la Confluencia Celular y Funcionalidad. Una muestra de material implantable se extrajo al cabo de, o aproximadamente, los días 3 o 4, 6 o 7, 9 o 10 y 12 o 13, las células se contaron y se evaluó la viabilidad y se construyó una curva de crecimiento y se evaluó para valorar las características de crecimiento y determinar si se había conseguido la confluencia, la casi confluencia o la postconfluencia. Los recuentos celulares se consiguen por digestión completa de la alícuota de material implantable con una solución de 0,5 mg/ml de colagenasa en una solución HEPES/CaCl<sub>2</sub>. Después de medir el volumen del material implantable digerido, se diluyó un volumen de suspensión celular conocido con azul de tripano al 0,4 % (4:1 células con respecto al azul de tripano) y la viabilidad se evaluó mediante exclusión con azul de tripano. Las células viables, no viables y totales se enumeraron usando un hemocitómetro. Las curvas de crecimiento se construyen representando el número de células viables frente al número de días en el cultivo. Preferentemente, un material implantable que comprende células se implanta después de que las células hayan alcanzado la confluencia pero pueden usarse células postconfluentes o casi confluentes. Si las células no son confluentes los días 12 o 13, se cambian los medios y la incubación continúa durante un día más. Este proceso continúa hasta conseguir la confluencia o hasta 14 días después de la siembra. El día 14, si las células aún no son confluentes, el lote típicamente, pero no necesariamente se descarta. Si se determina que las células son confluentes después de realizar comprobaciones durante el proceso, se realiza un cambio de medio final. Este cambio de medio final se realiza usando EGM-2 sin rojo fenol y sin antibióticos. Inmediatamente después del cambio de medio, los tubos se cierran herméticamente con capuchones protectores estériles para su envío.

El material implantable se ensaya además para indicios de funcionalidad antes del implante. Por ejemplo, se recogen los medios condicionados durante el periodo de cultivo para evaluar los niveles de heparán sulfato, factor β<sub>1</sub> de crecimiento transformante (TGF-β<sub>1</sub>), factor de crecimiento de fibroblastos básico (b-FGF) y óxido nítrico (NO) producido por las células endoteliales cultivadas y la capacidad de las células para inhibir el crecimiento de las células de la musculatura lisa y la trombosis *in vitro*. Los medios condicionados se evalúan de acuerdo con ensayos y parámetros anteriormente descritos. Un ensayo actualmente preferido es el ensayo de heparán sulfato que puede usarse solo para confirmar la funcionalidad. Como alternativa, puede usarse en combinación con uno o más de los ensayos para TGF-β<sub>1</sub>, b-FGF y NO producido por las células injertadas y/o en combinación con el ensayo de células de musculatura lisa *in vitro* descrito en cualquier parte del presente documento.

50 Composiciones y Métodos de Crioconservación del Material Implantable. El material implantable, que comprende una población casi confluyente, confluyente o postconfluyente de células injertadas en una matriz biocompatible, puede crioconservarse para un almacenamiento prolongado durante meses a años, o indefinidamente. Además de reducir el tiempo y costes de fabricación, la crioconservación proporciona material disponible, completamente ensayado, viable e implantable funcional confirmado para uso clínico en cualquier momento y sin ninguna producción o días de retraso de transporte.

55 El material implantable puede crioconservarse cuando las células están casi confluentes, confluentes o postconfluentes. De acuerdo con diversas realizaciones, el material implantable se crioconserva de 10 a 14 días después de la siembra de las células en la matriz biocompatible, más preferentemente de 10 a 12 días después de la siembra y más preferentemente 12 días después de la siembra. En general, las células endoteliales son preconfluentes o confluentes o están alrededor de 10 días después de la siembra y están 2-3 días postconfluentes o están alrededor de 12 días después de la siembra.

Antes de y opcionalmente después de la crioconservación, se evalúa el material implantable con respecto al número celular, viabilidad e indicaciones de función. Los ensayos de función celular ejemplares incluyen la evaluación de los niveles de heparán sulfato (HS), factor de crecimiento transformante (TGF)-β<sub>1</sub>, factor de crecimiento de fibroblastos básico (b-FGF) y óxido nítrico (NO) y la capacidad de inhibir el crecimiento de células de la musculatura lisa (SMC)



5 cultivadas. Además, el fabricante y/o el médico pueden evaluar la viabilidad celular usando un ensayo de azul de tripano, descrito con detalle anteriormente, antes de la administración del material implantable a un paciente. De acuerdo con una realización preferida, el material implantable es aceptable si el recuento de células total es igual a o mayor que 400.000 células/cm<sup>3</sup>, del 80 % al 90 % o más de las células son viables, el heparán sulfato está presente al 0,23 µg/ml/día o mayor y el TGF-β<sub>1</sub> está presente a 300 pg/ml/día o superior. De acuerdo con una realización adicional, el material implantable es aceptable en el nivel de b-FGF es de 300 pg/ml/día o inferior.

10 De acuerdo con una realización, el material implantable se crioconserva en una composición de medio de crioconservación que comprende un crioconservante complementado con un polisacárido y suero. De acuerdo con una realización preferida, el material implantable se crioconserva en una composición de medio de crioconservación que comprende 5 ml de solución CryoStor™ CS-10 (BioLife Solutions, Oswego, NY) que contiene DMSO al 10 % y está complementado con dextrano al 4,5 % y FBS al 50%. De acuerdo con realizaciones adicionales, la concentración de FBS es mayor que la cantidad de FBS usado en el cultivo celular, es del 20 al 80 %, más preferentemente del 40 % al 60 % y más preferentemente del 50 %. De acuerdo con realizaciones adicionales, la concentración de DMSO es del 5 % al 20 % de DMSO, más preferentemente del 7 % al 15 %, más preferentemente DMSO al 10 %. De acuerdo con realizaciones adicionales, la concentración de dextrano es del 2 % al 8 %, más preferentemente del 4 % al 6 % y más preferentemente del 4,5 %. De acuerdo con una realización, el dextrano tiene un peso molecular de 10.000 a 500.000, más preferentemente de 20.000 a 200.000, más preferentemente de 70.000. De acuerdo con una realización preferida, la composición de medio de crioconservación tiene un pH de 6,8 a 8,0, más preferentemente de 7,2 a 7,6, lo más preferentemente de 7,4.

25 De acuerdo con un método de crioconservación, el material implantable se transfiere de su vial de cultivo celular a un vial de criogenia de 15 ml (Nalgene®, Nalge Nunc Int'l, Rochester, NY), al cual se añade 5 ml de composición de medio de crioconservación. De acuerdo con realizaciones adicionales, el vial de criogenia tiene un volumen de 6 a 10 ml, más preferentemente de 10 a 15 ml, y más preferentemente de 15 ml. De acuerdo con una realización, la proporción de volumen del medio de crioconservación con respecto al volumen de aire en los viales de criogenia es de 1:1 a 1:2, más preferentemente de 1:1 a 2:3, más preferentemente de 1:1.

30 De acuerdo con un método de crioconservación, el vial de criogenia que contiene el material implantable y la composición de los medios de crioconservación se coloca en un envase congelado (Mr. Frosty™, Nalge Nunc Int'l, Rochester, NY). Se añade isopropanol al envase congelado para cargar aproximadamente una mitad del volumen del envase congelado. De acuerdo con una realización, el envase congelado se transfiere después a un refrigerador a -20 °C. De acuerdo con otra realización, el envase congelado se transfiere después a un congelador a -80 °C. De acuerdo con una realización adicional, después de aproximadamente 16 horas en el congelador a -80 °C, el envase congelado se transfiere a una fase de vapor con nitrógeno líquido (de aproximadamente -140 °C a -160 °C). De acuerdo con diversas realizaciones, el envase congelado se mantiene a una temperatura de -4 °C a -160 °C, más preferentemente -20 °C, -80 °C o -160 °C y más preferentemente -140 °C a -160 °C. El material implantable puede permanecer en un estado crioconservado durante 2 meses, 4 meses, 6 meses, 8 meses, 10 meses, 12 meses y más de acuerdo con diversas realizaciones.

40 Si el material implantable no se descongela lentamente, el material biocompatible tiende a disgregarse en diversos trozos, reduciendo la integridad de la matriz, la confluencia y la viabilidad celular. La integridad del material se mejora descongelando el material implantable lentamente. De acuerdo con un método preferido de descongelación lenta el material implantable, el vial de criogenia que contiene el material implantable congelado y el medio de crioconservación se extrae del congelador (-4 °C a -80 °C) o de la fase de vapor de nitrógeno líquido (-40 °C a -160 °C) y se descongela a temperatura ambiente durante 15 minutos seguido de una descongelación de 15 minutos adicional en un baño con agua a temperatura ambiente. Después, el material implantable se extrae del vial de criogenia y se lava para retirar el resto de los medios de crioconservación.

50 De acuerdo con una realización, el material implantable se descongela en el laboratorio para la evaluación *in vitro*. De acuerdo con esta realización, el material implantable se lava dos veces en 15 ml de medio de lavado (EBM-PRF y 50 µg/ml de gentamicina) durante 5 minutos a temperatura ambiente, seguido de un lavado final en 15 ml de medio de lavado durante 30 minutos a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 %. Después de los procedimientos de lavado, el material implantable se coloca en 10 ml de EGM-2 a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 % durante un período de recuperación de 48 horas. El material implantable puede acondicionarse opcionalmente durante 24 horas adicionales antes de su uso clínico o para envasado posterior envasado del material implantable para el transporte.

60 De acuerdo con otra realización, el material implantable se descongela en el centro médico para el implante de un paciente. De acuerdo con esta realización, el material implantable se extrae del vial de criogenia y se lava dos veces en 500 ml de medio de lavado. De acuerdo con diversas realizaciones, el medio de lavado comprende solución salina de calidad USP, solución de Ringer lactada, y EBM-PRF a temperatura ambiente. El material implantable permanece en la primera solución de medio de lavado durante de 1 a 40 minutos, más preferentemente de 2 a 25 minutos, y en la segunda solución de medio de lavado durante de 1 a 20 minutos, más preferentemente de 1 a 10 minutos. El material implantable se extrae del segundo medio de lavado y se implanta en el paciente.

65

Invasado Para Transporte terrestre y Aéreo del Material Implantable. Los viales de transporte del material implantable envasados para almacenamiento a temperatura ambiente, y destinados para el transporte mediante transporte terrestre o aéreo se envasan de acuerdo con uno de los siguientes métodos. De acuerdo con un método, se colocan en cada una de dos bolsas de plástico re-sellables tres viales de transporte y se sellan las bolsas. Después, se envasan dos bolsas (seis viales) en una caja interna. De acuerdo con otro método, se coloca cada vial en una bolsa de plástico re-sellable individual y se sella la bolsa. Después, se envasan cuatro viales en un cilindro de plástico. Cada una de las configuraciones de envase descritas se diseñan para proporcionar capas delimitadoras múltiples para proteger el producto de los efectos térmicos, daños producidos durante el transporte y para mantener un entorno limpio, estéril. La caja interna o el cilindro de plástico se envasa después en una caja de transporte externa aislada. La caja de transporte externa utiliza insertos de espuma y envases de gel para mantener el entorno térmico deseado (preferentemente 15-25 °C) y para proteger contra los daños producidos durante el transporte. La documentación apropiada se incluye en cada lote. Los viales que contienen el material implantable, así como la caja interna o cilindro de plástico y la caja de transporte externa también se marcarán apropiadamente.

Los viales de criogenia del material implantable envasado para conservación a -20 °C, -80 °C o a -140 °C a -160 °C y destinados para el transporte mediante transporte terrestre o transporte aéreo se envasan de acuerdo con uno de los siguientes métodos. De acuerdo con un método, se coloca cada vial de criogenia en una bolsa de plástico re-sellable individual y se sella la bolsa. Después, se envasan los viales de criogenia en una caja interna aislada, por ejemplo, una caja interna de espuma de Styrofoam™ (Dow Chemical Co., Midland, MI), que contiene hielo seco. Los viales de criogenia se entierran o sumergen en el hielo seco. La caja interna utiliza hielo seco (preferentemente a -80 °C) para mantener el medio térmico deseado (preferentemente de -80 °C a -160 °C) y para proteger los viales de criogenia contra los daños producidos durante el transporte. La caja interna de Styrofoam™ se envasa después en una caja de transporte externa aislada. De acuerdo con una realización, después de llegar al centro médico, los viales de criogenia se colocan en un refrigerador a -20 °C o -80 °C durante un período de almacenamiento prolongado. De acuerdo con otra realización, después de llegar al centro médico, los viales de criogenia se someten a un método de aclarado y descongelado, descrito anteriormente, para un implante inmediato al paciente.

De acuerdo con diversas realizaciones, el material implantable puede mantenerse por crioconservación en medios de crioconservación de durante aproximadamente un mes a un año, estar precedido y/o seguido de aproximadamente al menos tres semanas de almacenamiento en medios de transporte aproximadamente a temperatura ambiente antes de su uso manteniendo al mismo tiempo la viabilidad y funcionalidad del material implantable.

Inmediatamente antes del implante, el material implantable se extrae del transporte, del medio de crioconservación o de acondicionamiento y se aclara dos o tres veces en 250-500 ml de una solución salina estéril (USP) para eliminar los constituyentes de los medios restantes, incluyendo el FBS. El fabricante y/o el médico pueden ensayar la viabilidad de una alícuota de muestra del material implantable antes del implante, por ejemplo, usando un ensayo de azul de tripano, descrito con detalle anteriormente.

Una vez que el solicitante o el agente del solicitante ha recibido un pedido de materiales implantables, se iniciará una serie de acontecimientos ilustrados a continuación: Se preparará un implante crioconservado para el transporte en hielo seco como se ha descrito anteriormente, o se preparará un implante sembrando una matriz biocompatible con células y permitiendo que crezcan *in vitro* hasta que presenten uno o más de los fenotipos funcionales descritos anteriormente. Las células para la siembra pueden obtenerse de un banco de células como se ha explicado anteriormente, o pueden obtenerse directamente del receptor deseado del implante. Sin importar la fuente o tipo de célula presente en un material implantable, no se requiere que la célula se ensaye primero con respecto a la compatibilidad con el receptor deseado. Es decir, el tratamiento con un material implantable de la presente invención no requiere realizar un ensayo de tipificación celular, coincidencia celular o compatibilidad celular con respecto al receptor deseado antes de la fabricación o implante. Cuando se prepara de acuerdo con las enseñanzas expuestas en el presente documento, el tratamiento con un material implantable es un régimen de tratamiento independiente de tipificación celular, libre de compatibilidad celular, libre de coincidencia. Esta característica de la presente invención contradice tajantemente los tratamientos convencionales basados en células, tejidos u órganos que rutinariamente requieren pre-ensayo para determinar que existe una equivalencia entre el receptor objeto del implante y la célula, tejido u órgano a implantar; en ausencia de una equivalencia, no se producirá el tratamiento. La presente invención obvia la necesidad de un pre-ensayo para determinar si existe una equivalencia proporcionando de este modo al médico un aporte ininterrumpido fácilmente disponible de materiales implantables para el tratamiento de una cualquiera de las lesiones o enfermedades descritas en el presente documento.

#### Ejemplos

##### Ejemplo 1: Estudio de fístula AV en seres humanos

Este ejemplo proporciona protocolos experimentales para ensayar y usar una realización preferida de material implantable que comprende células endoteliales vasculares para potenciar la maduración de una fístula y/o impedir que fracase la maduración de una fístula. Usando métodos quirúrgicos convencionales, se crea una fístula arteriovenosa en la localización anatómica deseada. El material implantable en una forma plana flexible se dispone

después en el espacio perivascular adyacente a la fístula quirúrgicamente creada; los detalles de un método ejemplar se exponen más adelante. Como se ha descrito anteriormente, la colocación y configuración del material implantable puede variar para adaptarse a las circunstancias clínicas. En este estudio, se representa una forma plana flexible ejemplar preferida al menos en las FIGS. 1 o 2A.

- 5 Los experimentos y protocolos expuestos a continuación proporcionan orientación suficiente:
1. Para evaluar el fracaso de maduración de la fístula arteriovenosa a los 3 meses.  
Para este estudio, la insuficiencia de maduración se define como la incapacidad de permitir la canulación repetitiva de la fístula para diálisis y obtener flujo sanguíneo para diálisis suficiente dentro del intervalo de 35-500 ml/min, con un flujo sanguíneo preferido de al menos 350 ml/min, aproximadamente 12 meses después de la creación de la fístula. Se emplearán prácticas clínicas convencionales.
  - 10 2. Evaluar el caudal de acceso y anatomía (% del área de estenosis) por ultrasonido Doppler de flujo a color los días 5, 2 semanas, 1, 3 y 6 meses y en posteriores momentos.  
15 La disminución del flujo de acceso absoluto entre la medición inicial (día 5 post-quirúrgico) y 6 meses post-quirúrgicos se mide por ultrasonido Doppler de flujo a color. La magnitud de la estenosis determinada por ultrasonido Doppler a los 6 meses cuando se compara con el valor inicial (valor del día 5 post-quirúrgico). Se emplearán prácticas clínicas convencionales.
  - 20 3. Evaluar la respuesta de anticuerpos de HLA asociada con el uso de un producto celular alogénico.  
Evaluación inmunológica cuantitativa de la presencia de anticuerpos de HLA de los donantes a los 5 días, 2 semanas, 1, 3 y 6 meses post-cirugía y comparado con niveles pre-quirúrgicos. Se emplearán prácticas clínicas convencionales.
  - 25 Específicamente, el estudio incluye 10 pacientes urémicos humanos que se someten a cirugía de fístula arteriovenosa. Los pacientes que se han sometido a cirugía de fístula AV recibirán (inmediatamente después de la cirugía) la aplicación de dos (2) 1 x 4 x 0,3 cm (1,2 cm<sup>3</sup>) realizaciones de una forma plana flexible; una (i) colocada en la unión anastomótica y la otra colocada longitudinalmente en el segmento de vena proximal, distal a la anastomosis. 5 pacientes más participarán pero no recibirán implantes. Estos 5 pacientes se usarán para la comparación con la norma asistencial.
  - 30 El seguimiento clínico se realizará a los 5 días, 2 semanas y a 1, 3 y 6 meses. Las mediciones de flujo de acceso usando ultrasonido Doppler de flujo a color se realizarán el día 5 para establecer un nivel inicial, seguido de 2 semanas, 1 mes, 3 meses y 6 meses después de la cirugía. Los pacientes que presentan un flujo absoluto de menos de aproximadamente 350 ml/min, o presentan una reducción de flujo mayor del 25 % de la medición previa o que presentan un área de estenosis mayor del 50 % (medido por ultrasonido Doppler) se remitirán para angiografía. La intervención clínica reparadora tal como angioplastia permitirá lesiones estenóticas mayores del 50 %, determinadas por angiografía. Los pacientes con fístula que fracasan en maduración al cabo de 12 semanas se referirán para un diagnóstico de formación de imágenes. La intervención clínica reparadora convencional, incluyendo angioplastia y cirugía para unir las ramificaciones o revisar la fístula, se permitirán para ayudar con la maduración funcional en las fístulas que no han madurado al cabo de 12 semanas. La duración de la participación en el estudio de cada paciente será de 6 meses.
  - 35 Por consiguiente, en este ensayo clínico participó un total de 15 pacientes. Uno de cada diez pacientes recibirá 2 implantes y se usarán 5 pacientes que reciben cuidados asistenciales convencionales para comparación. Los pacientes que se someten a colocación de fístula AV para acceso de hemodiálisis también participarán.
  - 45 Cada uno de los diez pacientes tratados con el material implantable de la presente invención tiene una colocación de fístula AV convencional, medicaciones, tratamientos e implantes, de acuerdo con el siguiente diseño de estudio. Los primeros 5 de estos pacientes recibirán dos implantes, en una forma plana flexible, uno en el sitio anastomótico y uno colocado longitudinalmente en el segmento de la vena proximal, distal a la anastomosis. Después del tratamiento del último paciente dentro de este primer grupo, antes del tratamiento del siguiente grupo se realizará un periodo de observación al cabo de un mes. Después de una revisión satisfactoria de datos de 1 mes de los 5 primeros pacientes, se tratarán los 5 pacientes finales.
  - 50 Cinco pacientes participarán en el ensayo clínico y recibirán colocación de fístula AV convencional, medicaciones, tratamientos pero no material implantable. Estos pacientes se usarán para comparación con la norma de la atención médica y recibirán un seguimiento similar respecto al diagnóstico por formación de imágenes e inmunológico al que los pacientes tratados con implante.
  - 55 Los procedimientos de cirugía de fístula AV convencionales deben realizarse de acuerdo con técnicas operativas convencionales. Después de finalizar la fístula, pero antes del implante, se realizará la medición del diámetro de la vena eferente.
  - 60 Se usarán fórceps no dentados para levantar suavemente el material implantable en forma plana de los cuencos de lavado. El material implantable se aplicará después de completar la cirugía de acceso y la fístula de paso de flujo se
  - 65

establece habiéndose realizado todas las mediciones iniciales. Se controlará cualquier tipo de sangrado y el área a tratar se secará al máximo posible antes de colocar el material implantable. El/las área(s) no se irrigará(n) después de colocar el implante. Se usarán uno o dos implante(s) para tratar el sitio anastomótico. El otro implante se usará para tratar el segmento de la vena proximal, distal a la anastomosis. En determinadas realizaciones, el extremo de las conexiones vasculares laterales se tratará pasando un extremo del implante bajo el segmento anastomótico hasta que el centro del implante esté en el punto en el que confluyen los vasos. Ambos extremos se envuelven después alrededor de la línea de sutura que mantiene el implante en el centro sobre la línea de sutura. El segmento venoso proximal (distal a la anastomosis arteriovenosa) se tratará colocando el material implantable longitudinalmente a lo largo de la longitud de la vena comenzando en el sitio anastomótico. El material implantable no requiere que se envuelva completamente la circunferencia de la vena.

El seguimiento de los pacientes se realizará con procedimientos de cuidados convencionales durante el tiempo de recuperación en el hospital después de la cirugía de fístula AV. Los signos vitales se controlarán con mucha atención. Se registrarán las medicaciones simultáneas. Se informará a los pacientes sobre la necesidad de visitas de seguimiento a los 5 días, 2 semanas y a los 1,3 y 6 meses.

El flujo de acceso se registrará el día 5 (inicio), 2 semanas y después de esto a los 1, 3 y 6 meses post-cirugía. El grado de estenosis también se determinará por ultrasonido Doppler el día 5 para establecer un nivel inicial y de nuevo a las 2 semanas, 1, 3 y 6 meses con fines comparativos. Se obtendrá un espécimen de sangre completa de 5 cc para proporcionar suero para la determinación de los niveles de anticuerpo anti-HLA a los 5 días, 2 semanas, 1, 3 y 6 meses post-cirugía.

El flujo de acceso se determinará usando ultrasonido Doppler de flujo a color el día 5 ( $\pm 24$  h) para establecer una medición inicial y a las 2 semanas ( $\pm 2$  días), 1 mes ( $\pm 4$  días), 3 y 6 meses ( $\pm 7$  días) post-cirugía. Los pacientes que presentan un flujo absoluto menor de aproximadamente 350 ml/min, o que presentan una reducción mayor del 25 % en el flujo de su medición previa o que presentan un área de estenosis mayor del 50 % (medida por ultrasonido Doppler) se referirán a angioplastia. La intervención clínica reparadora tal como angioplastia se permitirá para lesiones estenóticas de más del 50 % de estenosis determinada por angiografía. Los pacientes con fístula que no madura al cabo 12 semanas se referirán para diagnóstico por formación de imágenes. La intervención clínica reparadora convencional, incluyendo la angioplastia y cirugía para unir las ramas laterales o revisar la fístula, permitirá ayudar a la maduración funcional en la fístula que no ha madurado al cabo de 12 semanas. Dicha intervención puede seguirse por implante del material implantable para potenciar la maduración de la fístula revisada y/o mantener funcionalmente la fístula revisada y recuperar un fracaso o fístula fracasada.

Resultados esperados del estudio de fístula AV. Se espera que los pacientes tratados con el material implantable de la presente invención como se ha descrito anteriormente presenten uno o más indicios de una mejora de la maduración de la fístula y/o prevención de fracaso de maduración de la fístula. Específicamente, los pacientes tratados individualmente presentarán, por ejemplo, un flujo sanguíneo mejorado, hasta un flujo suficiente para diálisis (por ejemplo, un flujo sanguíneo en el intervalo de 35-500 ml/min y preferentemente al menos 350 ml/min) y/o una capacidad mejorada de canular repetidamente la fístula para diálisis. Otro de los indicios de la maduración de la fístula es el grosor de la pared de la vena; una fístula en maduración o madura satisfactoriamente presenta un engrosamiento de la pared de la vena. Esta se medirá usando ultrasonido intravascular (IVUS) de acuerdo con las prácticas clínicas convencionales. En resumen, se usará IVUS para medir el espesor de la pared de la vena y definir el espesor de la capa íntima y la media. La fístula tratada o la del control se canulará y se colocará la sonda de ultrasonido dentro de venas y arterias diana. Incluso otros indicios de una fístula en funcionamiento es el diámetro adecuado del lumen. Se espera que el material implantable de la presente invención permita mantener un diámetro de lumen adecuado permitiendo de este modo que el flujo sanguíneo no se detenga a velocidades adecuadas para la diálisis eficaz, es decir, el flujo sanguíneo que es marginalmente mayor que la velocidad de la bomba de la máquina de diálisis; o, al menos, una velocidad de sangre adecuada para impedir la recirculación durante la diálisis. El diámetro del lumen se controlará en serie usando angiografía de la fístula comenzando el día 5 después de la creación de la fístula y después de esto al menos 3 meses post-cirugía. El estrechamiento del lumen post-cirugía se correlacionará con las velocidades de flujo sanguíneo usando protocolos de ultrasonido Doppler convencionales. Se espera que el material implantable impida o retrase el estrechamiento que impide el flujo sanguíneo por debajo de una velocidad adecuada para la diálisis tal como se describe en el presente documento. Este estrechamiento del lumen que caracteriza el fracaso de una fístula puede producirse debido a estenosis y engrosamiento asociado de la íntima, o puede producirse por una reducción y/o contracción del vaso sin ningún engrosamiento asociado. En el caso de un engrosamiento real, una intervención de angioplastia es actualmente un medio clínico convencional; en el caso de reducción y/o contracción debida, por ejemplo, a remodelación tisular negativa, la dilatación es actualmente una intervención clínica convencional. Se espera que una fístula tratada con implante no requiera angioplastia o dilatación.

Como un grupo, se espera que los pacientes tratados muestren al menos diferencias graduales en al menos uno de estos indicios anteriormente mencionados de maduración en comparación con los controles.

Ejemplo 2: Estudio en animales de injerto AV

Este ejemplo proporciona protocolos experimentales para ensayar y usar una realización preferida de la presente invención para promover la formación de un injerto AV funcional en sujetos de ensayo animales. Usando procedimientos quirúrgicos convencionales, se creó un injerto AV entre la arteria carótida y la vena yugular. Después el material implantable se dispuso en el espacio perivasculare adyacente a cada anastomosis de injerto AV creada quirúrgicamente; los detalles de un procedimiento ejemplar se exponen más adelante. Como se ha descrito anteriormente, la colocación y configuración de material implantable puede variar. En este estudio, el material implantable tenía forma plana flexible como se representa en las FIGS. 4A, 4B y 4C.

Específicamente, el estudio incluyó 26 sujetos de ensayo porcinos que se sometían a cirugía de injerto AV. Los procedimientos de cirugía de injerto AV convencionales se realizaron de acuerdo con técnicas operativas convencionales. El material implantable se aplicó a las anastomosis de injerto AV y proximidades como se describe más adelante después de completar la cirugía de injerto y establecer el flujo a través del injerto.

Para cada sujeto de ensayo que se somete a cirugía de injerto AV, se colocó un injerto PTFE de diámetro interno de seis milímetros entre la arteria carótida común izquierda y la vena yugular externa derecha del sujeto de ensayo. Se creó una anastomosis oblicua terminolateral en cada extremo del injerto usando una sutura continua 6-0 prolene. Todos los sujetos de ensayo recibieron heparina intra-operatoria y se les administró aspirina diariamente después de la cirugía.

Diez de los sujetos de ensayo recibieron material implantable que comprendía células endoteliales aórticas el día de la cirugía. Cinco de estos implantes se aplicaron a cada sujeto de ensayo. Dos implantes se envolvieron alrededor de cada uno de los sitios anastomóticos. En esta circunstancia, un extremo del material implantable se pasó bajo el segmento anastomótico hasta que el centro del implante estuviese en el punto donde el vaso y el injerto convergen. Después, ambos extremos se envolvieron alrededor de la línea de sutura manteniendo el implante en el centro sobre la línea de sutura. Los extremos se solaparon mínimamente para garantizar que el material estaba en su sitio. Se colocó un implante sencillo adicional longitudinalmente a lo largo de toda la longitud del segmento venoso proximal comenzando en la anastomosis, de cada sujeto de ensayo. El implante no necesita envolver completamente la circunferencia de la vena.

Los sitios anastomóticos se envolvieron con material implantable, por ejemplo, como se ilustra en las FIGS. 4A y 4B. Adicionalmente, se trató el segmento venoso proximal (distal a la anastomosis de la arteriovenosa) colocando el material implantable longitudinalmente a lo largo de la longitud de la vena comenzando en el sitio anastomótico, por ejemplo, como se ilustra en la FIG. 4C.

Diez sujetos de ensayo recibieron implantes de control sin células, envueltos alrededor de sitios anastomóticos y colocados en el segmento venoso proximal del injerto el día de la cirugía, por ejemplo, como se representa en las FIGS. 4A, 4B y 4C. Unos 6 sujetos de ensayo adicionales no recibieron ningún tipo de implante. Estos 6 sujetos de ensayo se usaron para comparación con la norma de atención médica. La carga celular total basada en el peso corporal era de aproximadamente  $2,5 \times 10^5$  células por kg. Se espera que esta carga celular sea aproximadamente al menos de 6-10 veces la carga celular estimada que se usará en un estudio clínico en seres humanos como se describe más adelante.

Procedimiento quirúrgico. Se realizó una incisión de 15 cm en la línea media longitudinal del cuello y la arteria se aisló carótida común izquierda seguida de la vena yugular externa izquierda. Se liberó un segmento de vena de 8 cm de los tejidos circundantes y todos los afluentes de la vena se unieron con suturas de seda de 3-0. Se sujetó la arteria carótida izquierda y se realizó una arteriotomía circunferencial de 7 mm de diámetro. Se realizó una anastomosis oblicua terminolateral entre la arteria y un injerto PTFE de diámetro interno de 6 mm usando una sutura continua de 6-0 prolene. Una vez establecida, la sujeción arterial se retiró y el injerto se lavó con abundante solución salina con heparina. Se confirmó flujo a través de la arteria en el injerto. Después se hizo un túnel en el injerto por debajo de los músculos esternocleidomastoideos y se llevó cerca de la vena yugular externa derecha.

Se realizó una venotomía en circunferencia de 7 mm de diámetro directamente en la vena yugular externa. Después el injerto arteriovenoso se completó con una anastomosis oblicua terminolateral entre el injerto PTFE y la vena yugular externa derecha usando una sutura continua de prolene 6-0 (la longitud del injerto era entre 15-25 cm y se registró en el momento de la colocación). Se retiraron todas las sujeciones y se confirmó el flujo a través del injerto. La arteria carótida izquierda distal se unió doblemente a la anastomosis PTFE con suturas de seda de 3-0.

Después de finalizar la anastomosis, se colocó el injerto arteriovenoso PTFE para impedir que se retorciese. El injerto arteriovenoso PTFE se canuló percutáneamente con una aguja de mariposa de calibre 23 inmediatamente distal a la anastomosis del injerto de la arteria carótida. Para confirmar la colocación, se aspiró sangre en el sistema con una jeringa de 10 cc. Después se lavó el sistema abundantemente con 10 cc de solución salina. Después se colocó un fluoroscopio con forma de brazo en C sobre el cuello del animal de estudio de modo que la anastomosis del injerto venoso y el tracto del flujo venoso pudieran visualizarse. Con fluoroscopia continua, se inyectaron 10-15 cc de contraste yodado (Renografina, resistencia máxima). La cineangiografía se registró y se conservó para comparar con el angiograma antes del sacrificio.

Después de finalizar la angiografía, los sitios anastomóticos se envolvieron en una esponja húmeda de calibre 4"x4". Se mantuvo la presión en los sitios anastomóticos durante un periodo de aproximadamente 5 minutos, antes de extraer las esponjas gasa e inspeccionar los sitios anastomóticos. Si no se había conseguido la hemostasis, lo cual se ponía en evidencia mediante exudado sanguíneo, el sitio se volvió a envolver durante otros 5 minutos. Se colocaron suturas adicionales a criterio del cirujano si la hemorragia en el sitio era grave. Una vez realizada la hemostasis, la herida del cuello se llenó con solución salina estéril y se realizó un análisis de sonda de flujo en el tracto efluente venoso distal usando una sonda de flujo Transonic de 6 mm. Se retiró la solución salina, siempre que fuera necesario, y las anastomosis se realizaron tan secas como fuera posible y se trataron bien con material implantable que comprendía células endoteliales aórticas o implantes control. Hasta no haber controlado el sangrado los sitios no se trataron con ningún tipo de implante, confirmando el flujo de paso del injerto y el área se secó tanto como fuera posible. Cuando estuvo completo, se cerró la herida en capas y se dejó que el animal se recuperase de la anestesia.

Se administró heparina antes de la cirugía como una inyección en embolada de 100 U/kg más una infusión continua de 35 U/kg/h y se mantuvo hasta el final de la cirugía. Se administraron dosis en embolada adicionales (100 U/kg), siempre que fue necesario para mantener la ACT  $\geq$ 200 segundos.

Permeabilidad del Injerto. La permeabilidad del injerto AV se confirmó mediante mediciones de flujo de acceso usando un ultrasonido Doppler de flujo a color y una sonda de flujo Transonic (Transonic Systems, Inc., Ithaca, NY) inmediatamente después de la cirugía, 3-7 días después de la cirugía y una vez a la semana después de esto. Los injertos se controlaron muy de cerca con respecto al flujo sanguíneo.

Procedimientos Patológicos. Los sujetos de los ensayos en animales se anestesiaron usando pentobarbital sódico (65 mg/kg, IV). Los injertos PTFE se expusieron y se realizó una fotografía digital del injerto PTFE y la anastomosis venosa. Después, el injerto arteriovenoso PTFE se canuló percutáneamente con una aguja de mariposa de calibre 23 inmediatamente distal a la anastomosis del injerto de la arteria carótida. Para confirmar la colocación, se aspiró sangre en el sistema con una jeringa de 10 cc. Después, el sistema se lavó abundantemente con 10 cc de solución salina. Después se colocó un fluoroscopio con forma de brazo en C sobre el cuello del animal de modo que se visualizara la anastomosis del injerto venoso y el tracto de flujo venoso. Con fluoroscopia continua, se inyectaron de 10-15 cc de contraste yodado (Renografina, fuerza completa). La cineangiografía se registró a los ángulos de 0° y 90° con respecto al injerto PTFE. La permeabilidad del injerto y el grado de estenosis del tracto del flujo venoso se determinó mediante lectura ciega de los angiogramas de necropsia en comparaciones por pares con angiogramas después de la colocación. Los angiogramas se clasificaron en una escala de 0-5 dependiendo del grado de estenosis observado en el angiograma. El esquema de clasificación empleado fue el siguiente: 0 = 0 % de estenosis, 1 = 20 % de estenosis, 2 = 40 % de estenosis, 3 = 60 % de estenosis, 4 = 80 % de estenosis y 5 = 100 % de estenosis. Se esperaba que los injertos tratados con el material implantable de la presente invención mostrasen un porcentaje de estenosis disminuido en comparación con el control después de examinar los angiogramas.

Histología. La mitad de los sujetos de los ensayos en animales (5 sujetos con implante de células injertado; 5 sujetos con implante control; 3 sujetos sin implantes) se sometieron a eutanasia 3 días después de la cirugía. Los sujetos de los ensayos en animales restantes (5 sujetos con implante de células injertadas; 5 sujetos con implante control; 3 sujetos sin implantes) se sometieron a eutanasia un mes después de la cirugía.

Se realizó una necropsia limitada, definida como el examen macroscópico del sitio de administración, que incluía todos los sitios anastomóticos y venosos proximales, y tejido circundante incluyendo nódulos linfáticos de drenaje en todos los sujetos de ensayo. Los tejidos de la mayor parte de órganos, incluyendo cerebro, pulmones, riñones, hígado, corazón y bazo se recogieron y guardaron para todos los sujetos de ensayo sometidos a eutanasia un mes después de la cirugía. Los órganos se analizaban únicamente si se manifestaban hallazgos inusuales a partir del examen macroscópico de la superficie externa del cuerpo o examen microscópico de los sitios de administración y tejido circundante. No se produjo ningún hallazgo inusual que justificase un examen adicional de los órganos principales en ninguno de los animales que participaron en el estudio.

Todos los sitios anastomóticos de injerto AV y tejidos circundantes, incluyendo cada segmento de 5 cm de la vena y arteria anastomosadas, se cortaron, se fijaron en formalina al 10 % (o equivalente) y se incluyeron en glucometilacrilato (o equivalente). Usando aproximadamente cortes de secciones de un espesor de 3  $\mu$ m con una cuchilla de acero inoxidable con perfil en C (o equivalente), las secciones se prepararon de al menos tres regiones: la anastomosis del injerto de la vena, anastomosis de la arteria del injerto y tracto del eflujo venoso. Se realizaron tres secciones transversalmente a través de la anastomosis del injerto de la vena. Se realizaron cinco secciones a través del tracto de eflujo venoso (por lo tanto cubriendo 1,5 cm de la vena de eflujo). Se realizaron tres secciones a través de la anastomosis de la arteria de injerto a intervalos de 1 mm. Las tres secciones se montaron en portaobjetos cubiertos con gelatina (o equivalente) y se tiñeron con hematoxilina y eosina o con tinción de elastina de Verhoeff.

Se determinó la inflamación perivasculare y luminal tanto aguda (sujetos de 3 días) y crónica (sujetos de 1 mes). La inflamación aguda estaba señalada por granulocitos, principalmente neutrófilos, mientras que la inflamación crónica estaba señalada por macrófagos y linfocitos. Adicionalmente, también se tiñeron secciones con los siguientes

marcadores específicos: anti CD45 para identificar leucocitos, anti CD3 para identificar células T, CD79a para identificar células B y MAC387 para identificar monocitos/macrófagos.

5 Los portaobjetos teñidos se examinarán y puntuarán con respecto a la presencia de células de la musculatura lisa y células endoteliales y para indicaciones de integración entre la anastomosis arterial o venosa y el material de injerto artificial. Todas las secciones del tejido aislado, incluyendo el material injertado, la íntima/seudoíntima, la parte interna de la media cerca del lumen, la parte externa de la media cerca de la adventicia, y la adventicia de cada una de las anastomosis de injerto de la vena, la anastomosis de la arteria de injerto y el tracto de flujo venoso se evaluarán y puntuarán. El tamaño de cada uno de los compartimentos tisulares, por ejemplo, la íntima, la media y la  
10 adventicia, se medirán en micrómetros. Cada sección se evaluará con respecto a la presencia y/o grado de cada uno de los siguientes criterios. Se evaluarán los indicios de inflamación, incluyendo pero sin limitación, la presencia y el grado de neutrófilos, linfocitos, macrófagos, eosinófilos, células gigantes y células plasmáticas. Las secciones de injertos se evaluarán con respecto a la presencia de fibroblastos, neovascularización, calcificación, hemorragia, congestión, fibrina, fibrosis del injerto e infiltración del injerto. Adicionalmente las secciones tisulares se evaluarán  
15 con respecto a los indicios de degeneración, incluyendo pero sin limitación la degeneración, pérdida de elastina y/o ausencia de la parte tisular, vacuolación de microfibras de músculo liso y/o calcificación de tejido. Las secciones tisulares también se valoran con respecto a la proliferación de células endoteliales, proliferación de células de la subíntima, incluyendo pero sin limitación la neovascularización y la presencia de microfibras musculares lisas, fibroblastos y fibrosis. Cada una de las secciones tisulares medidas también se evaluará con respecto a la necrosis tisular y la presencia de material exógeno. Las puntuaciones se asignarán para cada variable en una escala de 0 a 4 (0 = cambios no significativos; 1 = mínimos; 2 = leve; 3 = moderado; y 4 = grave).

25 Las secciones adicionales de los sitios anastomóticos del injerto arteriovenoso solo de sujetos de ensayo de animales de un mes, se montarán en portaobjetos de vidrio y se teñirán (elastina de Verhoeff) para análisis morfológicos. Las mediciones de la capa luminal, media, íntima y el volumen de vaso total se tomarán usando planimetría digital computerizada con un videomicroscopio y programación informática personalizada para cada sección. Se determinará el grado de hiperplasia de la íntima en cada sección. Un método de cuantificación de la hiperplasia de la íntima es mediante la normalización del área de la íntima por el área de la pared del vaso total [(íntima, mm<sup>2</sup>) / (íntima + media, mm<sup>2</sup>)], o determinando el lumen residual [(lumen, mm<sup>2</sup>)/(lumen + íntima, mm<sup>2</sup>)].  
30

Resultados Para Sujetos Animales de injerto AV. Los sujetos tratados con el material implantable de la presente invención como se ha descrito anteriormente presentaron uno o más indicios de formación de un injerto AV clínicamente funcional. Los injertos AV tratados de acuerdo con los materiales y métodos divulgados en el presente documento soportaron velocidades de flujo sanguíneo suficientes para permitir la diálisis. La diálisis eficaz requiere un flujo sanguíneo que es marginalmente mayor que la velocidad de la bomba de la máquina de diálisis, o al menos una velocidad sanguínea adecuada para impedir la recirculación durante la diálisis. Además, los sujetos tratados individualmente presentaron una frecuencia reducida de dehiscencia definida como separación de la vena o arteria anastomótica del injerto PTFE y una integración mejorada del puente prostético definido como la proliferación y/o migración de células de la musculatura lisa o células endoteliales en o dentro del lumen del puente prostético. El eflujo sanguíneo del injerto A/V del sitio del eflujo venoso fue comparable al del sitio del injerto. Como se usa en el presente documento, comparable significa sustancialmente similar para fines clínicos. Por ejemplo, el caudal de sangre deseado es de aproximadamente 150-500 ml/min, preferentemente aproximadamente de 300-500 ml/min y más preferentemente de aproximadamente 350-400 ml/min.  
35  
40

45 Adicionalmente, la migración de las células de la musculatura lisa y/o células endoteliales en o dentro del puente prostético se medirá como un indicio de integración. Se contempla que el material implantable de la presente invención promueva la proliferación de las células de la musculatura lisa y la proliferación de células endoteliales así como la migración de ambas en el puente. Pueden obtenerse tres secciones de cinco micrómetros a través del injerto PTFE y teñirse con SMC actina y se evaluará para identificar SMC y Factor VIII (factor de von Willebrand) y/o  
50 PECAM-1 para identificar células endoteliales. Las células endoteliales se cuantificarán usando microscopia/morfometría y programas informáticos personalizados.

Incluso otro indicio de un funcionamiento de injerto A/V es el diámetro de lumen adecuado. Los implantes de la presente invención permiten mantener un diámetro de lumen adecuado reduciendo la estenosis del vaso y permitiendo de este modo que el flujo de sangre sin impedimentos a velocidades adecuadas para la diálisis eficaz, es decir, la diálisis eficaz que requiere un flujo sanguíneo que sea marginalmente mayor que la velocidad de la bomba de la máquina de diálisis o al menos un caudal de sangre adecuado para impedir la recirculación durante la diálisis. El diámetro del lumen y el porcentaje de estenosis se controlarán usando angiografía de las anastomosis del injerto arteriovenoso el día de la creación del injerto arteriovenoso y justo 30 días antes del sacrificio. El estrechamiento del lumen post-cirugía se correlacionó con las caudales de sangre usando protocolos ultrasonido Doppler convencionales.  
55  
60

El material implantable de la presente invención redujo la presencia y grado de estenosis y las anastomosis tratadas en comparación con los implantes control. El porcentaje de estenosis, determinado por angiografía, de cada sujeto de ensayo tratado en el estudio se presenta en la siguiente Tabla 1. En promedio, el material implantable redujo la estenosis al noventa y nueve por ciento, del 46 % en los animales de control al 2,5 % para los que recibieron  
65

implantes que comprendían células ([46 – 2,5] / 46 x 100). Los resultados se confirmarán histológicamente. Estos estudios ilustran que la presente invención impide o retrasa el estrechamiento que reduce el flujo sanguíneo por debajo de una velocidad adecuada para la diálisis, promoviendo de ese modo la funcionalidad de una anastomosis de injerto A/V.

5

Tabla 1 Resumen del estudio de injerto AV

Nº de Animal	Grupo	Porcentaje de Estenosis (ángulo 0º para injerto)	Porcentaje de Estenosis (ángulo 90º para injerto)	Promedio del Porcentaje de Estenosis
1656	2	30 %	20 %	25 %
1657	2	80 %	80 %	80 %
1664	2	60 %	80 %	70 %
1667	2	0 %	20 %	10 %
1624	3	ND	0 %	0 %
1659	3	0 %	0 %	0 %
1666	3	0 %	20 %	10 %
1670	3	0 %	0 %	0 %

Grupo 2: recibió implante control solo de matriz biocompatible.  
 Grupo 3: recibió material implantable en una forma plana flexible que comprendía células y material biocompatible.

Ejemplo 3: Estudio Clínico de Injerto AV en seres humanos

10 Este ejemplo proporciona protocolos experimentales para ensayar y usar la invención para promover la formación de un injerto AV funcional en sujetos de ensayo clínico en seres humanos. Usando métodos quirúrgicos convencionales, se creó una anastomosis de injerto AV en la localización anatómica deseada y se colocó un puente protésico de ePTFE entre la anastomosis arterial y venosa. Después del material implantable se dispuso en el espacio perivascular adyacente a cada anastomosis de injerto AV creada quirúrgicamente; los detalles de un procedimiento experimental se exponen más adelante. Como se ha descrito anteriormente, la colocación y configuración del material implantable la puede modificar el experto en la materia de una manera rutinaria.

15  
 20 Específicamente, el estudio incluye sujetos de ensayo humanos que se someten a cirugía de injerto AV. Los procedimientos de cirugía de injerto AV convencionales se realizaron de acuerdo con técnicas operatorias convencionales. El material implantable de la presente invención se aplicará a las anastomosis de injerto AV y proximidades como se describe más adelante después de finalizar la cirugía de injerto y establecer el flujo a través del injerto.

25 Los sujetos clínicos humanos recibirán una o más partes del material implantable el día de la cirugía. De dos a tres de dichas partes se aplicarán a cada sujeto de ensayo. Una parte del material implantable se envolverá alrededor de cada sitio anastomótico. Un extremo se pasará después bajo el segmento anastomótico hasta la mitad de la envoltura y el punto en el que el vaso y el injerto convergen. Después ambos extremos se envolverán alrededor de la línea de sutura que mantiene el implante en el centro sobre la línea de sutura. Los extremos pueden solaparse para asegurar que el material está en su sitio. Una parte sencilla adicional de material implantable se colocará en el segmento venoso proximal del injerto arteriovenoso longitudinalmente a lo largo de toda la longitud de la vena comenzando en la anastomosis, de cada sujeto de ensayo. El material implantable no requiere que envuelva completamente la circunferencia de la vena.

30  
 35 Los sitios anastomóticos se tratarán con implantes preferidos, por ejemplo, como se ilustra en las FIGS. 4A, 4B y 4C, o como se ilustra en la FIG. 5. Adicionalmente, en determinados pacientes, el segmento venoso proximal (distal a la anastomosis venosa arterial) se trata colocando un implante preferido longitudinalmente a lo largo de la longitud de la vena comenzando en el sitio anastomótico. Se espera que la carga celular total basada en el peso corporal sea de aproximadamente  $2,0 \times 10^4$  células por kg a aproximadamente  $6,0 \times 10^4$  células por kg.

40 Los seguimientos clínicos se realizarán a los 5 días, 2 semanas y 1, 3 y 6 meses. Las mediciones de flujo de acceso usando ultrasonido Doppler de flujo a color se requerirán el día 5 para establecer un nivel inicial, después a las 2 semanas, 1 mes, 3 meses y 6 meses post-cirugía. Los sujetos de ensayo que presentan un flujo absoluto inferior a de 350 ml/min o superior al 25 % de reducción de flujo de la medición previa o mayor de un 50 % de área de estenosis (medida por ultrasonido Doppler) se remitirán a angiografía. La intervención clínica reparadora tal como angioplastia se permitirá para lesiones estenóticas mayores del 50 % determinadas por angiografía.

La angiografía de contraste del injerto, así como los sitios anastomóticos arteriales y venosos, se realizará al inicio y a los 3 meses. El diámetro de lumen se calculará para cada región y se medirá la velocidad sistólica pico.

50 Resultados Esperados para el Estudio Clínico de Injerto AV Humano. Se espera que los sujetos tratados con el material implantable de la presente invención como se ha descrito anteriormente presenten uno o más indicios de formación de un injerto AV clínicamente funcional. Específicamente, los sujetos tratados individualmente presentarán, por ejemplo, un flujo sanguíneo mejorado, hasta al menos un flujo suficiente para diálisis (por ejemplo,



un flujo sanguíneo en el intervalo de 35-500 ml/min y preferentemente al menos 350 ml/min), una frecuencia reducida de dehiscencia definida como separación de la vena o arteria anastomótica del injerto PTFE, una frecuencia reducida de colecciones perigráficas serosas y pseudoaneurisma y/o una integración mejorada del puente prostético definido como la proliferación y/o migración de células de la musculatura lisa o células endoteliales en o dentro del lumen del puente prostético. El flujo sanguíneo fuera del injerto AV del sitio efluente venoso será comparable con el del sitio de injerto. Comparable significa sustancialmente similar para fines clínicos. Por ejemplo, el caudal sanguíneo deseado es de aproximadamente 150-500 ml/min, preferentemente aproximadamente de 300-500 ml/min y más preferentemente aproximadamente de 350-400 ml/min.

Adicionalmente, la migración de las células de la musculatura lisa y/o células endoteliales en o dentro del puente prostético se medirán por ultrasonido intravascular como un indicio de integración. Se espera que el material implantable de la presente invención, cuando se usa como se ha descrito en el presente documento, promueva la proliferación de la musculatura lisa y/o la proliferación de células endoteliales, así como la migración de ambas en el puente.

Incluso otro indicio de un funcionamiento de injerto AV es el diámetro de lumen adecuado. Se espera que los implantes de la presente invención permitan el mantenimiento de un diámetro de lumen adecuado por lo tanto permitiendo que el flujo de sangre no se impida a velocidades adecuadas para diálisis eficaz, es decir, una diálisis eficaz requiere un flujo sanguíneo que es marginalmente mayor que la velocidad de la bomba de la máquina de diálisis, o al menos una velocidad en sangre adecuada para impedir la recirculación durante la diálisis. El diámetro de lumen se monitorizará usando angiografía de la anastomosis del injerto arteriovenoso al inicio (aproximadamente 5 días después de la creación del injerto arteriovenoso) y, posteriormente, al menos 3 meses post-cirugía. El estrechamiento del lumen post-cirugía se correlacionará con velocidades de flujo sanguíneo usando protocolos ultrasonido Doppler convencionales. Se espera que la presente invención, cuando se usa como se ha descrito en el presente documento, impedirá o retrasará el estrechamiento que impide que el flujo sanguíneo por debajo de una velocidad adecuada para la diálisis como se describe en el presente documento.

En el caso de injertos AV, se espera que el material implantable de la presente invención impida o reduzca la frecuencia de dehiscencia.

Como un grupo, se espera al menos que los sujetos tratados presenten diferencias graduales en al menos uno de estos indicios de funcionalidad anteriormente mencionados en comparación con los controles.

#### Ejemplo 4: estudio de injerto periférico

Este ejemplo proporciona protocolos experimentales para ensayar y usar una realización preferida de la presente invención para promover la formación de un injerto periférico funcional en sujetos de ensayo. Usando procedimientos quirúrgicos convencionales, se crea una anastomosis de injerto periférico en la localización anatómica deseada y se coloca un puente prostético de ePTFE entre la anastomosis. Después se dispone el material implantable en el espacio prevascular adyacente a cada anastomosis de injerto periférica creada quirúrgicamente; los detalles de un procedimiento experimental se indican más adelante. Como se ha descrito anteriormente, la colocación y configuración del material implantable puede variar.

Específicamente, el estudio incluye sujetos de ensayo que se someten a cirugía de injerto periférica. Los métodos de cirugía de injerto periférico convencionales se realizarán de acuerdo con técnicas operatorias convencionales. El material implantable se aplicará a las anastomosis de injerto periférico y a las proximidades como se describe más adelante después de completar la cirugía de injerto y establecer el flujo a través del injerto.

Los sujetos de ensayo recibirán uno o más materiales implantables preferidos el día de la cirugía. Se aplicarán de dos a tres de dichos implantes a cada sujeto de ensayo. Un implante de este tipo se envolverá en cada sitio anastomótico. Un extremo del material implantable se pasará después por debajo del segmento anastomótico hasta que el medio de la envoltura esté en el punto en el que el vaso y el injerto convergen. Después los extremos se envuelven alrededor de la línea de sutura que mantiene el implante en el centro sobre la línea de sutura. Los extremos pueden solapar entre sí para garantizar que el material está en su sitio. Un implante sencillo adicional se colocarán en el segmento venoso proximal del injerto periférico, longitudinalmente a lo largo de la longitud de la vena comenzando en la anastomosis, de cada sujeto de ensayo. No se requiere que el implante envuelva completamente la circunferencia de la vena.

Los sitios anastomóticos se envolverán con material implantable, por ejemplo, como se ilustra en las FIGS. 4A, 4B y 4C, o como se ilustra en la FIG. 5. Adicionalmente, se trata el segmento de vaso proximal (distal a la anastomosis) colocando el material implantable longitudinalmente a lo largo de la longitud del vaso comenzando en el sitio anastomótico. La carga celular total basada en el peso corporal será de aproximadamente  $2,0 \times 10^4$  células por kg a aproximadamente  $6,0 \times 10^4$  células por kg.

El seguimiento clínico se realizará a los 5 días, 2 semanas y a los 1, 3 y 6 meses. Las mediciones de flujo sanguíneo usando ultrasonido Doppler de flujo a color se requerirán el día 5 para establecer un nivel inicial, después a las 2

semanas, 1 mes, 3 meses y 6 meses post-cirugía. Los sujetos de ensayo que presenten un flujo absoluto inferior de 350 ml/min o inferior a una reducción del 25 % en el flujo de la medición anterior o mayor del 50 % del área de estenosis (según se mide por ultrasonido Doppler) se remitirán a angiografía. La intervención clínica reparadora tal como la angioplastia se permitirá para lesiones estenóticas mayores del 50 % determinadas por angiografía.

5 Se realizará la angiografía de contraste del injerto, así como los sitios anastomóticos. Se calculará el diámetro de lumen para cada región y se medirá velocidad pico sistólica.

10 Resultados Esperados para los Sujetos de Injerto Periférico. Se espera que los sujetos tratados con el material implantable de la presente invención como se ha descrito anteriormente presenten uno o más indicios de formación de un injerto periférico clínicamente funcional. Los injertos periféricos tratados de acuerdo con los materiales y métodos divulgados en el presente documento soportarán el suficiente flujo sanguíneo para reestablecer o mantener una circulación sanguínea clínicamente aceptable. También, los sujetos tratados individualmente presentarán, por ejemplo, una frecuencia reducida de dehiscencia definida como la separación de la vena anastomótica del injerto PTFE, y/o una integración mejorada del puente prostético definida como la proliferación y/o migración de las células de la musculatura lisa o células endoteliales en o dentro del lumen del puente prostético. El eflujo sanguíneo del injerto periférico en el sitio de flujo será comparable al del sitio de injerto. Como se usa en el presente documento, comparable significa sustancialmente similar para fines clínicos. Por ejemplo, el caudal de sangre deseado es de aproximadamente 150-500 ml/min, preferentemente aproximadamente de 300-500 ml/min y más preferentemente aproximadamente de 350-400 ml/min.

15 Adicionalmente, se medirá la migración de las células de la musculatura lisa y/o células endoteliales en o dentro del puente prostético como un indicio de integración. Se espera que el material implantable de la presente invención promueva la proliferación de la musculatura lisa y/o proliferación de células endoteliales, así como la migración de ambas en el puente.

25 Incluso otro indicio de un funcionamiento de injerto periférico es el diámetro de lumen adecuado. Se espera que los implantes de la presente invención permitan mantener un diámetro de lumen adecuado permitiendo de este modo que se impida el flujo de sangre a velocidades suficientes para mantener la circulación periférica. El diámetro de lumen se monitorizará usando angiografía del injerto periférico al inicio y al menos 3 meses después de la creación de injerto. El estrechamiento del lumen post-cirugía se correlacionará con las velocidades de flujo sanguíneo usando protocolos de ultrasonido Doppler convencionales. Se espera que el material implantable de la presente invención impida o retrase el estrechamiento que impide que el flujo sanguíneo esté por debajo de la velocidad adecuada para la circulación periférica como se describe en el presente documento.

30 En el caso de injertos de derivación periférica, se espera que el tratamiento con el material implantable de la presente invención de cómo resultado velocidades de flujo sanguíneo que permitan una circulación clínicamente aceptable o que se aproxime a velocidades normales. El flujo dentro y fuera del injerto será comparable. Comparable significa sustancialmente similar para fines clínicos. Por ejemplo, el caudal de sangre deseado es de aproximadamente 150-500 ml/min, preferentemente aproximadamente de 300-500 ml/min y más preferentemente aproximadamente de 350-400 ml/min. Adicionalmente, se espera que el tratamiento promueva la proliferación y migración de las células de la musculatura lisa y/o células endoteliales en el injerto prostético o nativo.

35 En el caso de injertos de derivación periférica, se espera que el material implantable de la presente invención impida o reduzca la frecuencia de dehiscencia.

40 Como un grupo, se esperaba que los sujetos tratados mostrasen al menos diferencias graduales en al menos uno de estos indicios anteriormente mencionados de funcionalidad en comparación con los controles.

45  
50

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un material implantable criopreservado que comprende: (a) una matriz biocompatible injertada con células que tienen un fenotipo inhibidor de tal manera que son capaces de inhibir o interferir con la proliferación de células de la musculatura lisa vascular y en el que dichas células son casi confluentes, confluentes o postconfluentes y (b) un volumen de una composición de medio de criopreservación suficiente para mantener la viabilidad de las células, la integridad de dicho fenotipo inhibidor y de dicha matriz mientras que están criopreservadas, en el que dicha composición de medio de criopreservación comprende un criopreservante, un polisacárido y suero.
- 10 2. Un método de criopreservación de un material implantable que comprende: (a) una matriz biocompatible y (b) células injertadas que tienen un fenotipo inhibidor de tal manera que son capaces de inhibir o interferir con la proliferación de células de la musculatura lisa vascular y en el que dichas células son casi confluentes, confluentes o postconfluentes, comprendiendo dicho método las etapas de: inmersión del material implantable en una composición de medio de criopreservación que comprende un criopreservante, un polisacárido y suero, en el que las células permanecen viables, las células conservan dicho fenotipo inhibidor y la matriz queda intacta durante un periodo de tiempo prolongado mientras que se almacenan en dicha composición de medio de criopreservación a una temperatura de -4 °C.
- 15 3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la proporción de volumen de la composición del medio de criopreservación con respecto al volumen de material implantable es de 5:1.
- 20 4. El método de la reivindicación 2 o reivindicación 3, en el que el volumen de la composición del medio de criopreservación es de 5 ml.
- 25 5. El material de la reivindicación 1 o método de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que la cantidad de suero en dicha composición de medio de criopreservación es superior a la cantidad de suero para un cultivo de células rutinario.
- 30 6. El material o método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el medio de criopreservación comprende al menos el 20 % de suero.
- 35 7. El material o método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el medio de criopreservación comprende al menos el 50 % de suero.
- 40 8. El material o método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el suero es suero bovino fetal.
- 45 9. El material o método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cantidad de polisacárido en dicha composición de medio de criopreservación es superior a la cantidad de polisacárido para un cultivo de células rutinario.
- 50 10. El material o método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el medio de criopreservación comprende al menos del 2 al 8 % de polisacárido.
- 55 11. El material o método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el medio de criopreservación comprende al menos el 4,5 % de polisacárido.
- 60 12. El material o método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el polisacárido es dextrano.
13. El material o método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el medio de criopreservación comprende adicionalmente el 10 % de DMSO.
14. El material o método de acuerdo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que: (a) el almacenamiento se realiza a al menos -20 °C, -80 °C, -140 °C o -160 °C; (b) dicho periodo de tiempo prolongado es de 1 mes; (c) dicho periodo de tiempo prolongado es de 6 meses; (d) dicho periodo de tiempo prolongado es de 1 año; o (e) la viabilidad de las células es de al menos el 80 %.
15. El material o método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las células son células endoteliales o células de tipo endotelial.
16. El material o método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la matriz biocompatible injertada con las células tiene una forma plana flexible o una composición que puede ser fluida.

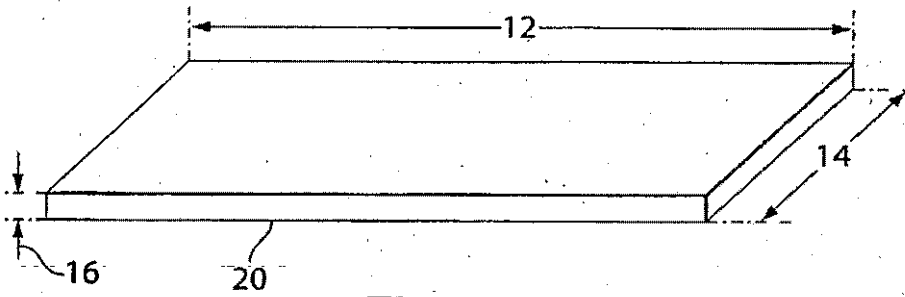


Fig. 1

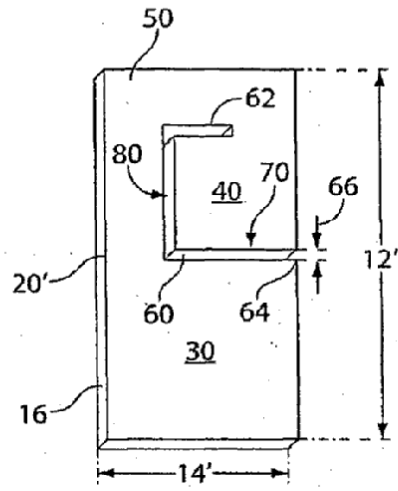


Fig. 2A

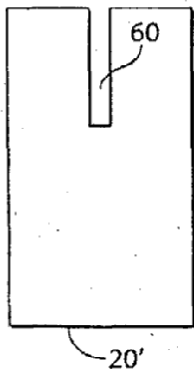


Fig. 2B

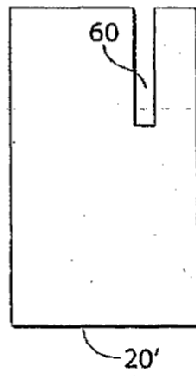


Fig. 2C

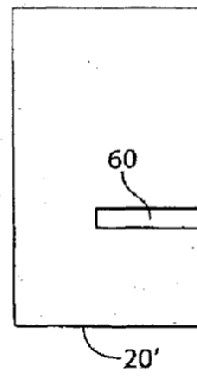


Fig. 2D

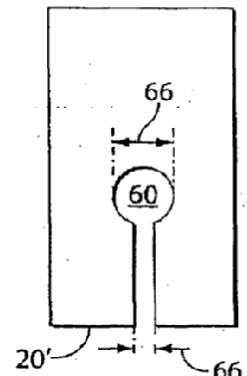


Fig. 2E

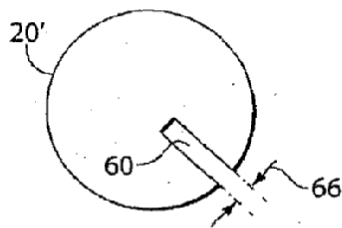


Fig. 2F

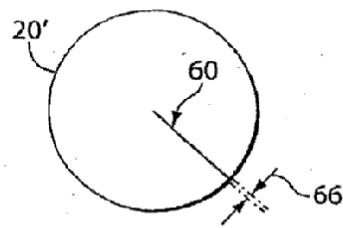


Fig. 2G

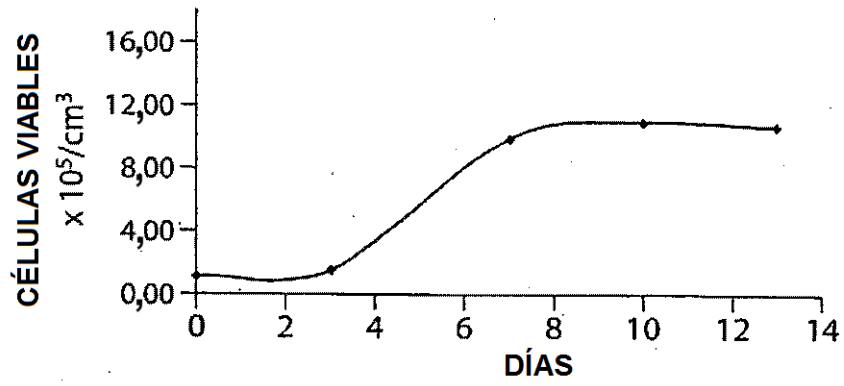


Fig. 3A

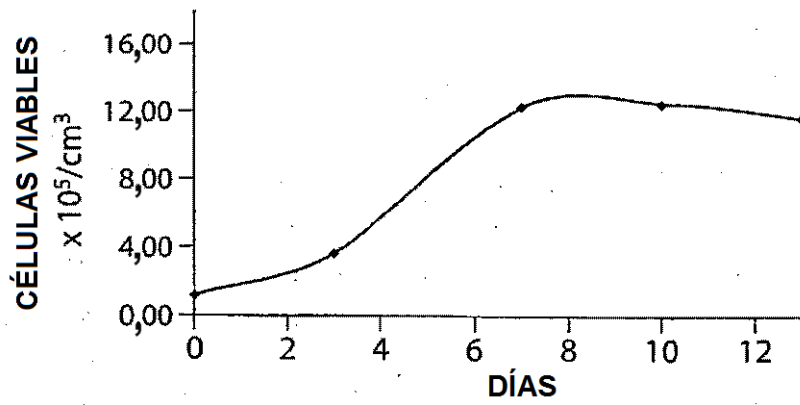


Fig. 3B

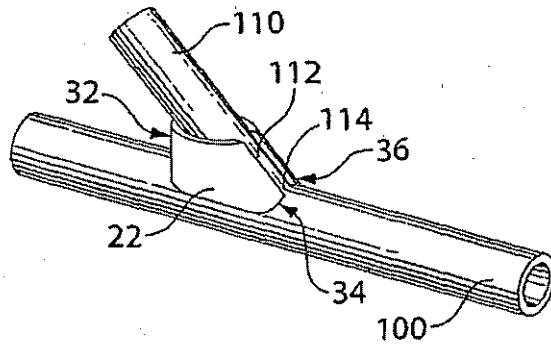


Fig. 4A

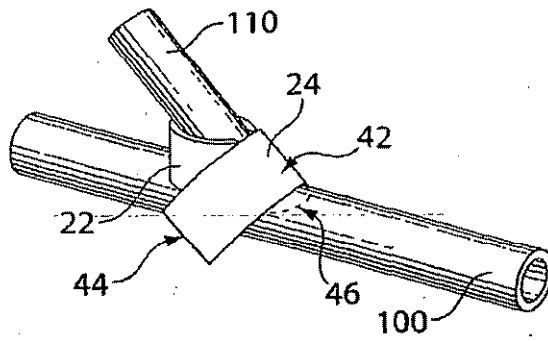


Fig. 4B

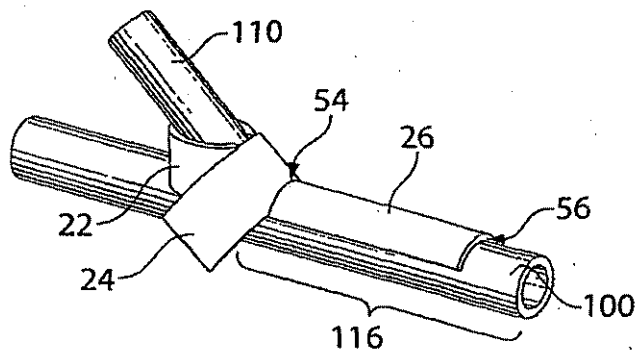


Fig. 4C

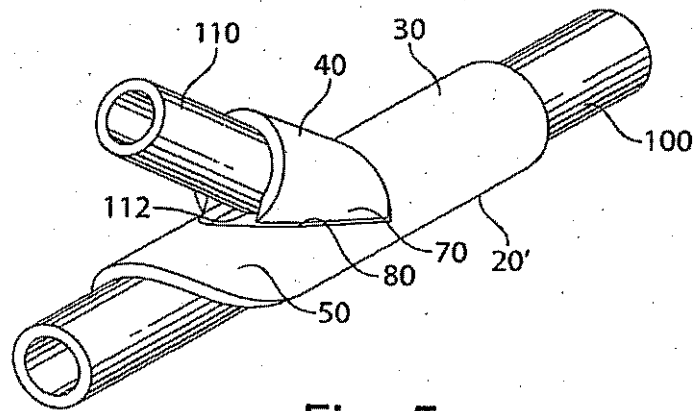


Fig. 5

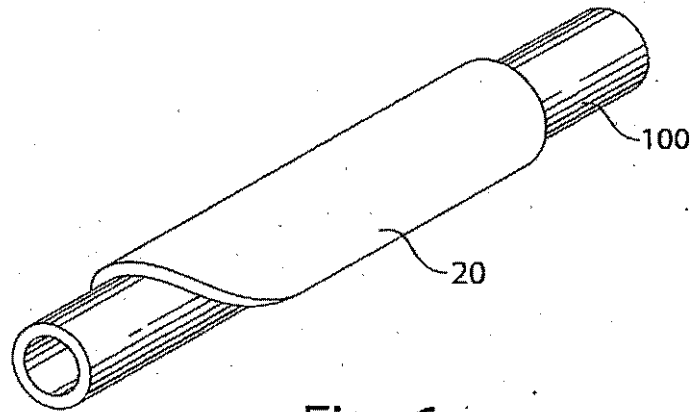


Fig. 6



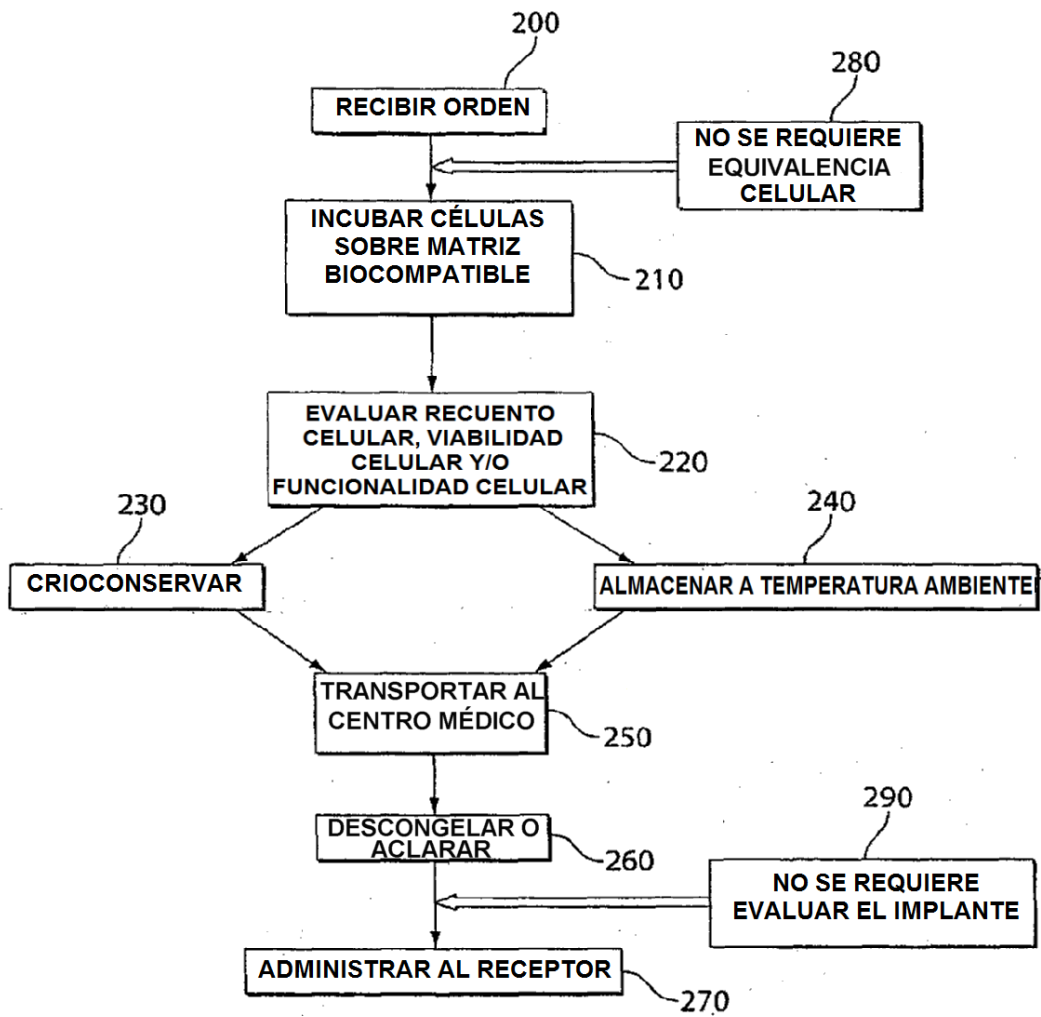


Fig. 7