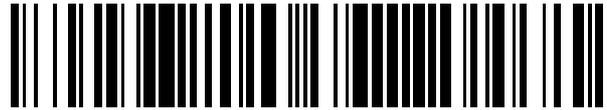


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 707**

51 Int. Cl.:

**A61L 27/36** (2006.01)

**A61L 27/38** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.09.2011 E 11776927 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.02.2016 EP 2611472**

54 Título: **Métodos de recelularización de un tejido u órgano para una mejor capacidad de trasplante**

30 Prioridad:

**01.09.2010 US 379073 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.03.2016**

73 Titular/es:

**REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MINNESOTA  
(100.0%)  
1000 Westgate Drive, Suite 160  
St. Paul, Minnesota 55114-8658, US**

72 Inventor/es:

**TAYLOR, DORIS y  
KREN, STEFAN M.**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 562 707 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

Métodos de recelularización de un tejido u órgano para una mejor capacidad de trasplante

**Campo técnico**

Esta divulgación se refiere en general a métodos de recelularización de un tejido u órganodescelularizado.

5 **Antecedentes**

10 Cuando un vaso sanguíneo sufre una lesión, o la matriz extracelular queda expuesta, las plaquetas y la fibrina forman un coágulo sanguíneo para prevenir la pérdida de sangre por la lesión. La trombosis es la formación del coágulo sanguíneo, que es denominado trombo, dentro de un vaso sanguíneo. El vaso sanguíneo puede ser una vena, una arteria o un capilar. Típicamente, un trombo obstruye, en diversos grados, el flujo de la sangre por el sistema circulatorio. *In vivo*, se utilizan agentes antitrombóticos y/o anticoagulantes para reducir la respuesta coagulante, pero no está demostrada su utilidad para reducir o eliminar la trombosis observada durante el trasplante de un órgano, tejido o andamio.

<US2009/202977 divulga métodos para la descelularización y la recelularización de órganos o tejido.>

**Resumen**

15 La invención viene definida por las reivindicaciones.

En un aspecto, se propone un método *in vitro* de recelularización de una matriz tisular u orgánica. Dicho método comprende típicamente la perfusión de una matriz tisular u orgánica, ej, una perfusión de matriz tisular u orgánica, con un tampón fisiológico bajo presión; y la reendotelización de la matriz tisular u orgánica con una composición fisiológica comprendiendo una población de células endoteliales o células progenitoras endoteliales. Una población típica de células endoteliales diferenciadas o células de músculo liso puede detectarse utilizando técnicas inmunocitoquímicas conocidas en la técnica incluyendo, por ejemplo, inmunofluorescencia de doble etiqueta, y métodos de inmunoperoxidasa que utilizan anticuerpos que detectan las proteínas celulares, para distinguir las características celulares o propiedades fenotípicas de las células endoteliales o células de músculo liso. Los marcadores celulares para células endoteliales incluyen, por ejemplo, cadherina VE, CD 144, CD 141, CD 106, o CD 142, mientras que los marcadores celulares de células de músculo liso incluyen Flk. La inmunocitoquímica puede utilizarse también para identificar las células endoteliales, detectando la expresión de genes de células endoteliales, como CD31 y e-NOS. Las poblaciones de células endoteliales maduras deben carecer relativamente de células hematopoyéticas, tales como poblaciones CD45+. También puede realizarse histoquímica de hibridación *in situ*, utilizando sondas de cDNA o RNA específicas para el gen endotelial mRNAs. Estas técnicas pueden combinarse con métodos inmunocitoquímicos para mejorar la identificación de fenotipos específicos. Los anticuerpos y sondas moleculares comentadas más arriba pueden aplicarse a procedimientos de Western y Northern blot, respectivamente, para ayudar a la identificación celular. En una realización, la población prácticamente pura es por lo menos 50%, 60%, 70% o más, como 80%, 85%, 90%, 95%, 99% o 100% células endoteliales o células progenitoras endoteliales. La descelularización por perfusión es un método *ex vivo* de descelularizar un órgano, parte (porción) de un órgano o tejido vascularizado de mamífero, donde una solución de descelularización es perfundida a través de un órgano, parte de un órgano o tejido vascularizado para facilitar la descelularización manteniendo los conductos vasculares. El órgano, matriz, andamio tisular o injerto descelularizado resultante mantiene un sistema vascular, comprendiendo un suministro arterial, espacio intersticial, donde residen los lechos capilares, y una salida venosa, de forma que se pueden introducir líquidos o células a través de uno o más puntos de entrada, ej. uno o más vasos, y que salgan del órgano, matriz, tejido o injerto por una vía distinta. Los órganos enteros con una entrada arterial primaria, tendrán un retorno venoso de fluido completo. Las porciones aisladas de órganos o tejidos tendrán una combinación de retorno venoso y salida de fluidos a través de la matriz intersticial expuesta, donde el tejido o porción del órgano fue excindido. Si está presente, la cápsula del órgano permanece intacta, ej. no facilita el movimiento de líquido acuoso a través de la cápsula, lo que contrasta con los órganos sujetos a descelularización por inmersión.

Las células endoteliales representativas incluyen, sin limitación, células endoteliales de la sangre, células endoteliales de la médula ósea, células endoteliales circulantes, células endoteliales de aorta humana, células endoteliales microvasculares cerebrales humanas, células endoteliales microvasculares dérmicas humanas, células endoteliales microvasculares intestinales humanas, células endoteliales microvasculares pulmonares humanas, células endoteliales microvasculares humanas, células endoteliales sinusoidales hepáticas, células endoteliales de vena safena humana, células endoteliales de vena umbilical humana, células endoteliales linfáticas, células endoteliales de microvaso, células endoteliales microvasculares, células endoteliales de arteria pulmonar, células endoteliales capilares retinianas, células endoteliales microvasculares retinianas, células endoteliales vasculares, células endoteliales de sangre de cordón umbilical, células endoteliales sinusoidales hepáticas, células endoteliales unidades formadoras de colonia (CFU-ECs), células angiogénicas circulantes (CACs), precursoras endoteliales circulantes (CEPs), células formadoras de colonias endoteliales (ECFC), ECFC de bajo potencial proliferativo (LPP-ECFC), ECFC altamente proliferativas (HPP-ECFC), o combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, las células endoteliales o las células progenitoras

endoteliales derivan de células madre embriónicas (ESC) excepto ESC humanas, células madre adultas, células progenitoras o células madre pluripotentes inducidas (iPSCs).

En determinadas realizaciones, la matriz tisular u orgánica es una matriz tisular u orgánica biológica. En determinadas realizaciones, la matriz tisular u orgánica biológica procede de un órgano seleccionado de entre el grupo formado por corazón, riñón, hígado, pulmón, páncreas, intestino, músculo, piel, mama, esófago, tráquea u omento. En determinadas realizaciones, la matriz tisular u orgánica biológica es una matriz tisular u orgánica descelularizada por perfusión. En determinados casos, la matriz tisular u orgánica biológica y las células endoteliales o células precursoras endoteliales son xenogénicas. En determinados casos, la matriz tisular u orgánica biológica y las células endoteliales o las células precursoras endoteliales son alogénicas.

En algunas realizaciones, este método incluye también introducir células distintas de las endoteliales o progenitoras endoteliales en o sobre la matriz tisular u orgánica antes de la fase de reendotelización. En alguna realización, este método incluye además la introducción de células distintas de las endoteliales, endoteliales derivadas, endoteliales inmaduras o progenitoras endoteliales en o sobre la matriz tisular u orgánica tras la fase de reendotelización.

Sedivulga un método de reducción de la trombogénesis y la inmunogenicidad en un tejido u órgano recelularizado, tras su trasplante a un receptor. Tal método comprende típicamente la perfusión de una matriz tisular u orgánica con un tampón fisiológico bajo presión; reendotelizar la matriz tisular u orgánica por perfusión de la matriz tisular u orgánica con una composición fisiológica comprendiendo una población de células endoteliales o células progenitoras endoteliales; y trasplantar la matriz tisular u orgánica reendotelizada al receptor. La trombogenicidad en los tejidos u órganos reendotelizados puede ser evaluada mediante tests y ensayos estándar de hemocompatibilidad, incluyendo, pero sin limitación, la activación plaquetaria, ruptura oxidativa, hemólisis, fibrinólisis, formación de fibrina, generación de trombina, activación de contacto, ensayo de trombomodulina y/o activación del complemento. En una realización, la matriz tisular u orgánica reendotelizada es adecuada para el trasplante, y permanece patente con el trasplante.

Las células endoteliales representativas incluyen, sin limitación, células endoteliales de la sangre, células endoteliales de la médula ósea, células endoteliales circulantes, células endoteliales de aorta humana, células endoteliales microvasculares cerebrales humanas, células endoteliales microvasculares dérmicas humanas, células endoteliales microvasculares intestinales humanas, células endoteliales microvasculares pulmonares humanas, células endoteliales microvasculares humanas, células endoteliales sinusoidales hepáticas, células endoteliales de vena safena humana, células endoteliales de vena umbilical humana, células endoteliales linfáticas, células endoteliales de microvaso, células endoteliales microvasculares, células endoteliales de arteria pulmonar, células endoteliales capilares retinianas, células endoteliales microvasculares retinianas, células endoteliales vasculares, células endoteliales de sangre de cordón umbilical, células endoteliales sinusoidales hepáticas, células endoteliales unidades formadoras de colonias (CFU-ECs), células angiogénicas circulantes (CACs), precursoras endoteliales circulantes (CEPs), células formadoras de colonias endoteliales (ECFC), ECFC de bajo potencial proliferativo (LPP-ECFC), ECFC altamente proliferativas (HPP-ECFC), o combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, las células endoteliales o las células progenitoras endoteliales se derivan de células madre embriónicas (ESC), células madre adultas, células progenitoras o células madre pluripotentes inducidas (iPSCs).

En determinadas realizaciones, la matriz tisular u orgánica es una matriz tisular u orgánica biológica. En determinadas realizaciones, la matriz tisular u orgánica biológica procede de un órgano seleccionado de entre el grupo formado por corazón, riñón, hígado, pulmón, páncreas, intestino, músculo, piel, mama, esófago, tráquea u omento. En determinadas realizaciones, la matriz tisular u orgánica biológica es una matriz tisular u orgánica descelularizada por perfusión.

En algunas realizaciones, la matriz tisular u orgánica biológica y las células endoteliales o las células precursoras endoteliales son xenogénicas. En algunas realizaciones, la matriz tisular u orgánica biológica y las células endoteliales o las células precursoras endoteliales son alogénicas. En algunas realizaciones, la matriz tisular u orgánica biológica es xenogénica respecto al receptor, y las células endoteliales o las células progenitoras endoteliales son alogénicas respecto al receptor.

En determinadas realizaciones, tal método incluye además introducir células distintas de las células endoteliales o progenitoras endoteliales en o sobre la matriz tisular u orgánica antes de la fase de reendotelización. En determinadas realizaciones, tal método incluye además introducir células distintas de las células endoteliales o progenitoras endoteliales en o sobre la matriz tisular u orgánica tras la fase de reendotelización. En determinadas realizaciones, tal método incluye además introducir células distintas de las células endoteliales o progenitoras endoteliales en o sobre la matriz tisular u orgánica tras la fase de trasplante. La composición fisiológica que incluye células distintas de las células endoteliales, endoteliales derivadas o células endoteliales inmaduras o células progenitoras endoteliales, puede ser introducida en la matriz tisular u orgánica mediante, por ejemplo, perfusión, inyección directa, aplicación tópica o combinaciones de todo ello.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el significado habitualmente entendido por alguien con experiencia normal en la técnica a la que pertenecen los métodos y composiciones de la materia. Si bien pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a los

descritos aquí en la práctica o en la comprobación de los métodos y composiciones de materia, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

**Descripción de los dibujos**

5 Figura 1. El Panel A es una gráfica que muestra la presencia de células en las construcciones cardiacas  
 recelularizadas, que fue calculada cuantificando los núcleos positivos DAPI en cuatro localizaciones de ejes  
 cortos distintos, distribuidas desde la base hasta el vértice (N=3 corazones por método). Se suministraron  
 10 células endoteliales aórticas de rata (RAECs) en una dosis única o en dos dosis. El número total de células  
 suministradas se indica entre paréntesis para cada método. El suministro en dosis única de células implicó la  
 perfusión de RAECs en la aorta distal a la tercera rama (Aorta), o vía la arteria braquiocefálica (BA). En los  
 suministros en dos dosis, la mitad de las células fue suministrada a través de la IVC, seguido por la mitad a  
 15 través de la BA (BA+IVC). La distribución de las RAECs por el conjunto de la matriz cardiaca fue visualizada  
 por marcaje Dil (ROJO) y DiO (VERDE) de las células antes del suministro. 40 millones de RAECs marcadas  
 Dil fueron suministrados vía BA en los Paneles B y C, mientras que se suministraron 20 millones de células  
 marcadas DiO vía IVC, seguidos de 20 millones adicionales de células marcadas Dil vía BA en los Paneles D y  
 E. Las barras de error son el error estándar de la media, y las barras de escala son 5 mm. \* indica  $p > 0,05$ .

La Figura 2 son fotografías en las que 20 millones de RAECs marcadas DiO (VERDE) se suministraron vía IVC  
 y 20 millones de RAECs Dil (ROJO) fueron suministrados vía BA y se visualizaron siete días después de la  
 20 siembra en andamios descelularizados (Paneles A-E). Se observaron RAECs marcadas en distintas  
 distribuciones en las paredes ventriculares (Paneles A-C) y sobre la superficie endocárdica (Paneles D-E). Los  
 núcleos positivos DAPI son AZULES (Paneles A-E). La barra de escala en los Paneles A-E es 50 micrones.

Figura 3. Los Paneles A-D son fotografías que muestran la evaluación histológica de ECM de corazón de rata  
 descelularizado reseñado con RAECs vía BA (40 millones de células, Paneles A - B), o BA e IVC (20  
 millones cada inyección, Paneles C - D). Los Paneles A y C son secciones teñidas con hematoxilina y eosina,  
 25 mientras que los Paneles B y D están teñidos con Verhoeff-van Gieson. El diámetro del vaso fue cuantificado y  
 agrupado de acuerdo con el tamaño de la pared del LV y del RV, y los datos se presentan en el Panel E (N=3  
 por conjunto de datos). La barra de escala es 250 micrones. Las barras de error son una desviación estándar  
 de la media. \* indica una diferencia estadísticamente significativa entre los métodos de suministro ( $p < .001$ )  
 para un diámetro de vaso determinado.

La Figura 4 son fotografías de construcciones de corazón de rata descelularizadas, sembradas el día 0 con 40  
 millones de RAECs por infusión en la BA (Panel A), o 30 millones de RAECs en la IVC (Paneles B y C). El día  
 7, las construcciones cardiacas fueron perfundidas con la tinción vital, CMFDA, vía aorta a células vivas  
 marcadas por fluorescencia (VERDE). Se observaron RAECs CMFDA-positivas en las paredes ventriculares  
 (Paneles A y B) y en la superficie endocárdica de la construcción cardiaca (Panel C), con independencia de la  
 35 vía de suministro. La muerte celular por apoptosis fue examinada con tinción TUNEL (Paneles D-I). Los  
 Paneles D-F son imágenes de eje corto representativas del ventrículo izquierdo, el septum y el ventrículo  
 derecho de construcciones con suministro de células vía BA. Los Paneles G-I son imágenes TUNEL del  
 ventrículo izquierdo, el septum y el ventrículo derecho de construcciones sembradas con células vía BA e IVC.  
 Los núcleos celulares están teñidos con DAPI (AZUL) y la tinción positiva TUNEL es ROJO. Para seguir  
 40 cuantificando los cambios en la viabilidad celular a lo largo del tiempo, se tomaron diariamente muestras del  
 medio y se cuantificó la actividad G6PDH (Panel J) (N=6). Las barras de error representan una desviación  
 estándar de la media. La barra de escala representa 100 micrones en los Paneles A-C, mientras en los  
 Paneles D-I, la barra de escala representa 250 micrones. # designa tinción TUNEL positiva. El Panel J es una  
 representación gráfica de los datos.

La Figura 5 son fotografías de tinción histoquímica de RAECs al cabo de siete días en andamios cardiacos  
 descelularizados, y muestran que las células siguen siendo viables, proliferativas (Panel A, VERDE es CMFDA  
 y ROJO es PCNA), y expresan marcadores de ECs activas funcionalmente (Panel B, ROJO es eNOS, VERDE  
 es CMFDA, AZUL es DAPI; Panel C, ROJO es vWF, VERDE es CMFDA, y AZUL es DAPI). Las matrices  
 reendotelizadas seguían siendo capaces de reducir la trombogenicidad de los andamios vía señalización de  
 50 trombomodulina (Panel D, N=6 para controles acelulares, N=8 para BA y BA+IVC). El número total de RAECs  
 suministradas en cada método viene indicado entre paréntesis. \* indica  $p < ,05$  en comparación con los  
 controles acelulares. Las barras de error son el error estándar de la media. La barra de escala representa 100  
 micrones.

La Figura 6 son fotografías que muestran una comparación entre explantes de andamios acelulares (Paneles A-  
 D) y explantes de construcciones reendotelizadas (Paneles E-H) siete días después del trasplante  
 heterotrópico. El examen macroscópico de la aorta y el ventrículo izquierdo de andamios acelulares (Paneles A  
 y B, respectivamente) y construcciones reendotelizadas (Paneles E y F, respectivamente) revelaron reducción  
 de la formación de trombos. La tinción con hematoxilina y eosina de andamios acelulares (Paneles C-D) y  
 construcciones reendotelizadas (Paneles G-H) reveló más sangre suelta en los andamios acelulares, y  
 60 cantidades comparables de células reclutadas en los explantes tanto de andamios acelulares, como de  
 andamios reendotelizados. \* indicav vasos patentes en las construcciones. Las barras de escala indican: 1 mm

en los Paneles A, B, E y F, 250 micrones en los Paneles C y G, 50 micrones en el Panel D y 100 micrones en el Panel H.

5 La Figura 7 son fotografías de tinción VEGF-R2 (ROJO) de andamios acelulares (Panel A) o construcciones reendotelizadas (Panel B) siete días después del trasplante. Tinción PECAM (ROJO) de un andamio acelular (Panel C) y una construcción reendotelizada (Panel D) 7 días después del trasplante. Los núcleos positivos DAPI son AZULES. La barra de escala representa 100 micrones. \* indica autofluorescencia de sangre.

### Descripción detallada

10 La trombosis de matrices tisulares u orgánicas recelularizadas es un fenómeno observado que ocurre tras el trasplante y reperfusión de tejidos u órganos con sangre. Además, los tejidos u órganos trasplantados son con frecuencia inmunogénicos, y el receptor muestra frecuentemente una respuesta inflamatoria contra el tejido u órgano trasplantado. Los métodos de recelularización de una matriz tisular u orgánica que se describen aquí reducen la trombogenicidad cuando la matriz tisular u orgánica es posteriormente trasplantada a un huésped y reperfundida con sangre. Los métodos de recelularización que se describen aquí producen también unos tejidos y órganos que, al ser trasplantados y reperfundidos con sangre, presentan una inflamación limitada.

15 En los métodos de recelularización de una matriz tisular u orgánica como se describen aquí, se puede utilizar una matriz tisular u orgánica biológica. Las matrices tisulares u orgánicas biológicas representativas incluyen, por ejemplo, corazón, hígado, riñón, pulmón, páncreas, bazo, útero, vejiga, esófago, tráquea, médula espinal, articulaciones (ej. rodillas, hombros o caderas), piel, mama, músculo, intestino, omento y tejido adiposo. Una matriz biológica puede incluir también, por ejemplo, una matriz de colágeno que haya sido secretado o remodelado por células. La recelularización de una matriz biológica, como se describe aquí, requiere típicamente que la matriz carezca, o por lo menos carezca sustancialmente, de células viables.

20 Los tejidos y órganos biológicos pueden ser descelularizados utilizando diversos métodos conocidos. Por ejemplo, un tejido u órgano biológico puede ser descelularizado mediante métodos de perfusión. Véase, por ejemplo, WO 2007/025233 y Ott et al. (2008, Nat. Med., 14:213-21) para descripciones de métodos de descelularización basados en la perfusión. Los métodos de descelularización por perfusión han demostrado que producen una matriz muy buena para la recelularización. Véase, por ejemplo, WO 2007/025233; Ott et al. (2008, Nat. Med., 14:213-21); Uygun et al., 2010, Nat. Med., 16(7):814-20; Petersen et al., 2010, Science, e-pub June; and Ott et al., 2010, Nat. Med., e-pub July.

25 Como alternativa a la descelularización basada en perfusión, los tejidos u órganos biológicos pueden ser descelularizados por inmersión en una solución de descelularización que elimina las células. Véase, por ejemplo, la Patente USA Nº 6 376 244 y 6 753 181. Además, como alternativa a la utilización de matrices tisulares u orgánicas biológicas, en los métodos de recelularización que se describen aquí se pueden utilizar matrices tisulares u orgánicas sintéticas, siempre que tales matrices sintéticas tengan una estructura vascular tipo lecho. Entre las matrices tisulares y orgánicas sintéticas se incluyen, por ejemplo, hidrogeles, polímeros (ej., PLGA, PLA biodegradables, o polímeros durables, como el poliuretano), andamios de colágeno, andamios de matriz ECM incluyendo colágeno, fibronectina, laminina y combinaciones de ellos.

30 Los métodos de recelularización de una matriz tisular u orgánica que se describen aquí incluyen la perfusión de una matriz tisular u orgánica con un tampón fisiológico bajo presión. Esta perfusión de la matriz tisular u orgánica bajo presión se realiza antes de introducir células en la matriz y, de forma similar a la perfusión utilizada en el proceso de descelularización descrito en WO 2007/025233, es vía la vasculatura u otro lumen o estructura de conducto (ej., la tráquea en los pulmones, el conducto biliar en el hígado, la uretra en el riñón, etc.) de la matriz orgánica o tisular, y generalmente comienza con la canulación de la vasculatura (ej., arterias, venas, arteriolas, vénulas y capilares), y/o otros lúmenes y/o conductos (en lo sucesivo estructuras "tipo vasculatura") de una matriz orgánica o tisular (de aproximadamente 1 a aproximadamente 300 Hg). Por tanto, la canulación incluye la inserción de una cánula en un conducto, cavidad o vaso corporal, como la tráquea, la vejiga, o un vaso sanguíneo, para introducir o extraer un líquido, una sustancia o un residuo. Como se aplica aquí, la perfusión de una matriz orgánica o tisular bajo presión, se refiere al suministro de una composición líquida (ej., un tampón fisiológico) bajo presión suficiente para que la vasculatura y las estructuras tipo vasculatura de la matriz tisular u orgánica se mantengan abiertas y expandidas, pero no tan alta como para producir daños o distensión de la vasculatura o las estructuras tipo vasculatura de la matriz tisular u orgánica. Un tampón fisiológico adecuado para la perfusión precelular de una matriz tisular u orgánica bajo presión, puede ser cualquier tampón que sea compatible con la matriz tisular u orgánica. Por ejemplo, entre los tampones fisiológicos pueden incluirse nutrientes tales como azúcares e hidratos de carbono, y pueden incluir también factores proendoteliales (ej., compuestos que tengan un efecto positivo sobre las células endoteliales o el endotelio), tales como, por ejemplo, compuestos que induzcan la angiogénesis (ej., VEGF, FGF-1 y/o bFGF). Un tampón fisiológico tiene generalmente pH fisiológico.

35 En una realización, el tampón fisiológico adecuado para la perfusión precelular o la perfusión celular incluye, pero sin limitación, el tampón fosfato salino (PBS) o soluciones de medio de cultivo adecuadas para el cultivo de células endoteliales incluyendo, pero sin limitación, EGM-2, EGM-2MV, DMEM, PromoCell Endothelial Cell

Medium, Medium 200, DMEMF/12, tampones junto con suplementos nutricionales, ej., glucosa, que pueden emplearse para la perfusión y/o conservación de órganos, incluyendo el trasplante. Entre ellos se incluye, por ejemplo, para tejidos cardiacos, el tampón Modified Krebs-Henseleit de la siguiente composición (en mM): 118 NaCl, 4,7 KC1, 1,2 MgSO<sub>4</sub>, 1,2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 11 glucosa, 1,75 CaCl<sub>2</sub>, y 2,0 piruvatoy 5 U/L de insulina, otampón Krebs conteniendo (en mM) 118 NaCl, 4,7 KC1, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 1,2 MgSO<sub>4</sub>, 1,2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub> gaseado con 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>; o glucosa (ej., 11 mM) en combinación con 1 o 1,2 mM palmitato. Para tejidos renales, un medio típico es KPS-1 Kidney Perfusion Solution (Solución de Perfusión Renal). Para tejidos hepáticos, un medio de ejemplo es el tampón Krebs-Henseleit conteniendo 118 mMNaCl, 4,7 mM KC1, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 mM NaHCO<sub>3</sub>, 8 mM glucosa, y 1,25 mM CaCl<sub>2</sub> complementados con 2% BSA.

10 Aunque no va vinculado a ningún mecanismo en particular, se cree que esta perfusión precelular bajo presión abre y enjuaga la matriz y, en particular, el lecho vascular de la matriz tisular u orgánica, exponiendo así más parte de la matriz a las células durante la reendotelización, y permitiendo el establecimiento de un endotelio viable en la vasculatura de la matriz tisular u orgánica. Los expertos en la materia entenderán que distintas matrices tisulares y orgánicas (ej., de diferentes fuentes, ej., corazón, hígado, pulmón, riñón, páncreas, etc.)  
15 pueden soportar distintos grados de presión. El nivel de presión que una matriz tisular u orgánica en particular puede soportar está relacionado, por lo menos parcialmente, con el lecho vascular de esa matriz tisular u orgánica concreta.

Los métodos de recelularización de una matriz tisular u orgánica que se describen aquí incluyen también la reendotelización de la matriz tisular u orgánica con células endoteliales, derivadas endoteliales, células endoteliales inmaduras o células progenitoras endoteliales. Las fuentes de células endoteliales incluyen las obtenidas de una recogida autóloga, ej. una biopsia. Las células endoteliales autólogas pueden ser obtenidas de un paciente vía la biopsia de una arteria, vena o un tejido específico, y colocadas en cultivo celular para el crecimiento normal de la población. La selección de células endoteliales se obtiene mediante condiciones de cultivo, donde VEGF o bFGF suprime las poblaciones celulares contaminantes, incluyendo las células de músculo liso, o por clasificación directa FACS u otros métodos de selección *ex vivo* disponibles, como perlas magnéticas, microfluidos, lab-on-a-chip, columna de afinidad o dispositivo asociado para la población a seleccionar para una población de células endoteliales pura, basado en cualquiera de los siguientes marcadores de superficie de células endoteliales aceptados incluyendo, pero sin limitación, CD31, VEGFR-1, VEGFR-2, CD105, CD144, TEM7, CD146 y/o D2-40.

30 Las células progenitoras endoteliales (EPCs) son células endoteliales inmaduras, con capacidad para proliferar, migrar y diferenciarse en células endoteliales, pero que no han adquirido todavía las características de células endoteliales maduras. Las EPCs pueden ser movilizadas de la médula ósea a la sangre periférica (EPCs circulantes) en respuesta a determinados estímulos fisiológicos como, por ejemplo, una lesión tisular. Las EPCs circulantes fueron identificadas en sangre humana de adulto (Asahara et al. (1997) Science 275:964-967), y posteriores estudios han sugerido un papel de las EPCs en el mantenimiento de la integridad y la función endotelial, así como en la neovascularización posnatal. Las EPCs pueden ser aisladas de la sangre, la médula ósea o la sangre de cordón, y son identificadas en la fracción celular CD34+ en las células mononucleares periféricas humanas adultas. Pueden ser aisladas utilizando células CD34+ o células CD 133+ solas o en combinación con KDR+ como una fracción celular rica en EPC en sangre periférica, vía clasificación FACS directa, u otro método de selección *ex vivo* disponible, tal como perlas magnéticas, microfluidos, lab-on-a-chip, columna de afinidad o dispositivo asociado. Las EPCs pueden ser entonces perfundidas directamente en la matriz y cultivadas en condiciones apropiadas para ayudar en la proliferación y la diferenciación, o cultivadas *in vitro* para aumentar las cifras globales de células en un medio de cultivo de mantenimiento de EPC, como el cultivo durante siete días en medio StemSpan® sin suero (StemCell Technologies, Vancouver, Canadá) durante el periodo inicial de expansión, y suplementarlo con 1% penicilina-estreptomicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE UU) y ligando Flt3 recombinante humano (rh) (100 ng/ml), factor rh de células madre (100 ng/ml), rh IL-3 (20 ng/ml), rh IL-6 (20 ng/ml). Esas células pueden ser entonces perfundidas en la matriz como EPCs, o prediferenciadas en ECs y perfundidas en la matriz. La diferenciación de las EPCs puede conseguirse mediante métodos tales como cultivando aproximadamente 3x 10<sup>5</sup> a aproximadamente 1x10<sup>6</sup>/1,5 ml/9,6 cm<sup>2</sup> en medio de cultivo-2 de células endoteliales (EGM-2) conteniendo FBS (2%), hidrocortisona, hFGF, VEGF, R<sup>3</sup>-IGF-1, ácido ascórbico, hEGF, gentamicina, anfotericina-B y heparina (Lonza, Basilea, Suiza). Tras tres días de cultivo, las células pueden ser recogidas y transferidas a placas recubiertas con fibronectina (10 µg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE UU) a una densidad de aproximadamente 1 x 10<sup>6</sup> células/1,5 ml/9,6 cm<sup>2</sup> y cultivadas durante tres días adicionales en medio EGM-2 fresco.

Se puede utilizar una población de células endoteliales o precursoras de células endoteliales alogénicas, y prepararlas a partir de tejido que sea alogénico al del receptor, comprobándolo para su uso por los métodos bien conocidos de tipificación tisular, para que coincida estrictamente con el tipo de histocompatibilidad del receptor. Entre ellos se incluyen, pero sin limitación, células endoteliales de vena umbilical humana (HUVECs), células endoteliales modificadas genéticamente para reducir la inmunogenicidad, células endoteliales emparejadas HLA, células endoteliales derivadas de sangre de cordón, ECs derivadas de EPCs, progenitoras, células iPS o células madre embriónicas. La mayoría de los métodos alogénicos requerirán el uso de agentes inmunosupresores postrasplante. Estudios recientes han demostrado la naturaleza inmunológica privilegiada de

las ECs derivadas de EPCs (Cardiovasc Res. 2010 Oct 1 ;88(1): 121-9. Epub 2010 abril 13), donde la supresión inmunológica no requerirá postrasplante. Entre los ejemplos de métodos de diferenciación de EPCs se incluyen: aislar las EPCs de la sangre por centrifugación de gradiente de densidad con Pancoll rata (PAN-Biotech), y la realización de una reducción de CD45 utilizando un anticuerpo monoclonal CD45. La fracción CD45 (-) se cultiva en un medio de diferenciación endotelial [EBM complementado con 5% FCS, 50 mg/ml gentamicina, 10 ng/ml VEGF rata, 1 ng/ml bFGF bovino, 10 ng/ml IGF-1 murino (ambos R&D Systems), 10 ng/ml EGF murino, y 1 mg/ml hidrocortisona] en placas recubiertas con 20 mg/ml de fibronectina. Las células no adherentes fueron eliminadas por cambio de medio cada 4 días. Aparecieron grupos de células en crecimiento tras aproximadamente de 15 a 22 días de cultivo, que son recogidas por tripsinización dentro de anillos de clonación. Las células PECAM-1(+) son seleccionadas con separación MACS utilizando un anticuerpo PECAM-1 elgGIMicroBeads. La fracción PECAM-1(+) puede seguir siendo cultivada hasta el paso 25 y profundizada en múltiples matrices.

Adicionalmente, una alternativa al empleo de técnicas de inmunosupresión, métodos de sustitución o bloqueo de genes utilizando la recombinación homóloga en células madre, propuesta por Smithies et al, 317 Nature 230-234 (1985), y ampliada a la sustitución o bloqueo de genes en líneas celulares (Zheng et al, 88 Proc. Natl. Acad. Sci. 8067-8071 (1991)), puede aplicarse a las células endoteliales y derivadas endoteliales para la ablación de genes del complejo de histocompatibilidad (MHC) importantes. Las células sin la expresión MHC permiten el injerto de poblaciones celulares endoteliales enriquecidas a través de barreras de histocompatibilidad alogénica o incluso xenogénica, sin la necesidad de inmunosupresión del receptor. Las revisiones generales y citas sobre el uso de métodos recombinantes para reducir la antigenicidad de las células del donante son publicadas también por Gruber, 54 Transplantation 1-11 (1992). Métodos típicos de la reducción de la inmunogenicidad de los trasplantes por modificación de superficie son presentados en la PCT International patent application WO 92/04033 and PCT/US99/24630. Alternativamente, la inmunogenicidad del injerto puede reducirse preparando células de un animal transgénico que tenga antígenos MHC alterados o eliminados.

Los precursores de células endoteliales incluyen, pero sin limitación, células endoteliales unidades formadoras de colonias (CFU-ECs), células angiogénicas circulantes (CACs), precursoras endoteliales circulantes (CEPs), células formadoras de colonias endoteliales (ECFC), ECFC con bajo potencial proliferativo (LPP-ECFC), y ECFC altamente proliferativas (HPP-ECFC).

En una realización, las células endoteliales y las progenitoras endoteliales son obtenidas mediante cultivo de células madre embrionarias (ESCs) o células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) en condiciones apropiadas para dirigir a las células madre por un linaje endotelial. Las células progenitoras endoteliales son células que han comenzado a diferenciarse en células endoteliales (ej., linaje restringido; ej., células destinadas a convertirse en células endoteliales), pero no son consideradas células endoteliales totalmente diferenciadas. Por ejemplo, las células progenitoras endoteliales pueden expresar un marcador de progenitoras como el CD 133, y pueden expresar también un marcador de células endoteliales como, pero sin limitación, molécula de adhesión celular endotelial y plaquetaria-1 (PECAM1; o CD31), VEGFR-1 (o Flt-1), VEGFR-2 (o Flk-1), proteína de unión a guanilato-1 (GBP-1), trombosmodulina (o CD141), cadherina VE (o CD 144), factor von Willebrand (vWF), y molécula de adhesión intercelular 2 (ICAM-2). Generalmente, las células progenitoras endoteliales pueden aceptar también el LDL acetilado, y además pueden migrar hacia VEGF y/o formar tubos en Matrigel.

Las ESCs o iPSCs, como las ESCs e iPSCs humanas, pueden seguir siendo cultivadas en condiciones que produzcan células endoteliales totalmente diferenciadas, ej., VEGF y bFGF. Adicional o alternativamente, pueden obtenerse células endoteliales de diversas fuentes, como médula ósea, sangre, piel, hígado, corazón, pulmón, retina y cualquier otro tejido u órgano que tenga células endoteliales. Por ejemplo, las células endoteliales representativas incluyen, sin limitación, células endoteliales de la sangre, células endoteliales de médula ósea, células endoteliales circulantes, células endoteliales de aorta humana, células endoteliales microvasculares cerebrales humanas, células endoteliales microvasculares dérmicas humanas, células endoteliales microvasculares intestinales humanas, células endoteliales microvasculares pulmonares humanas, células endoteliales microvasculares humanas, células endoteliales sinusoidales hepáticas, células endoteliales de vena safena humana, células endoteliales de vena umbilical humana, células endoteliales linfáticas, células endoteliales de microvaso, células endoteliales microvasculares, células endoteliales de arteria pulmonar, células endoteliales capilares retinianas, células endoteliales microvasculares retinianas, células endoteliales vasculares, células endoteliales de sangre de cordón umbilical y combinaciones de las anteriores. Como comprenderán los expertos en la técnica, esto no pretende ser una lista exhaustiva de células endoteliales.

Pueden obtenerse EPCs de la sangre periférica aislando células mononucleares de sangre periférica (PBMC) por centrifugación de gradiente de densidad. Se siembran suspensiones de células en cualquier receptáculo capaz de mantener células, en especial matraces de cultivo, placas de cultivo o botellas rotativas, y muy especialmente en pequeños matraces de cultivo como matraces de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>. Las células cultivadas en suspensión pueden ser resuspendidas a aproximadamente de 5x 10<sup>4</sup> a 2 x 10<sup>5</sup> células/ml (por ejemplo, aproximadamente 1x10<sup>5</sup> células/ml). Las células en placas sobre un sustrato fijo pueden ser plaqueadas a

aproximadamente de 2 a  $3 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup>. Opcionalmente, las placas de cultivo se cubren con una matriz proteica, como el colágeno. Las células pueden colocarse en cualquier medio de cultivo conocido capaz de mantener el crecimiento celular, incluyendo HEM, DMEM, RPMI, F-12, y similares, conteniendo los suplementos requeridos para el metabolismo celular, como son la glutamina y otros aminoácidos, vitaminas, minerales y proteínas, como la transferrina y similares. El medio de cultivo puede contener también antibióticos para evitar la contaminación por levaduras, bacterias y hongos, como penicilina, estreptomocina, gentamicina y similares. El medio de cultivo puede contener suero derivado de bovinos, equinos, pollos y similares. Las condiciones de cultivo en general deben ser muy parecidas a las fisiológicas. El pH del medio de cultivo debe ser similar al fisiológico (por ejemplo, entre pH 6-8, entre pH 7 a 7.8, o a pH 7.4). Las temperaturas fisiológicas van de 30° C a 40° C. Las EPCs pueden ser cultivadas a temperaturas de aproximadamente 32° C a 38° C. (por ejemplo, aproximadamente de 35° C a 37° C).

Opcionalmente, el medio de cultivo se suplementa con por lo menos un factor de crecimiento que induzca la proliferación ("mitogénico"). Un "factor de crecimiento" es una proteína, un péptido u otra molécula que tenga un efecto de crecimiento, induzca la proliferación, induzca la diferenciación, o tenga un efecto trófico sobre las EPCs. Los "Factores de crecimiento que inducen la proliferación" son factores tróficos que permiten la proliferación de las EPCs, incluyendo cualquier molécula que se una a un receptor sobre la superficie de la célula, para ejercer un efecto trófico o inductor de crecimiento sobre la célula. Entre los factores de crecimiento que inducen la proliferación se incluyen EGF, anfiregulina, factor de crecimiento fibroblástico ácido (aFGF o FGF-1), factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF o FGF-2), factor de crecimiento transformante alfa (TGF $\alpha$ ), VEGF y combinaciones de los anteriores. Los factores de crecimiento se añaden habitualmente al medio de cultivo a concentraciones que van de aproximadamente 1 fg/ml a 1 mg/ml. Concentraciones de aproximadamente 1 a 100 ng/ml resultan habitualmente suficientes. Se pueden realizar fácilmente ensayos de titulación simples para determinar la concentración óptima de un factor de crecimiento determinado. Los efectos biológicos de los factores de crecimiento y tróficos son generalmente mediados por unión a los receptores de la superficie celular. Se han identificado los receptores de varios de esos factores, y se dispone de anticuerpos y sondas moleculares para receptores específicos. Las EPCs pueden ser analizadas respecto a la presencia de factores de crecimiento en todos los estadios de diferenciación. En muchos casos, la identificación de un receptor concreto proporciona orientación respecto a la estrategia a aplicar para una mayor diferenciación de las células por vías de desarrollo específicas, con la adición de factores de crecimiento o tróficos exógenos.

En general, tras unos 3-10 días *in vitro*, el medio de cultivo de las EPCs se repone aspirándolo, y añadiendo medio nuevo al matraz de cultivo. Opcionalmente, el medio aspirado es recogido, filtrado y utilizado como medio de acondicionamiento y posterior paso de EPCs. Por ejemplo, se utiliza el 10%, 20%, 30%, 40% o más de medio de acondicionamiento. El cultivo de células EPC puede ser transferido fácilmente para reiniciar la proliferación. Por ejemplo, después de 3 a 7 días *in vitro*, se agitan bien los matraces de cultivo, y se transfieren entonces las EPCs a un tubo de centrifugado de 50 ml, y se centrifugan a baja velocidad. El medio es aspirado, las EPCs son resuspendidas en una pequeña cantidad de medio de cultivo, se cuentan entonces las células y se resiembran con la densidad deseada para reiniciar la proliferación. Este procedimiento puede repetirse semanalmente, y tiene como resultado un aumento logarítmico en el número de células viables en cada paso. El procedimiento prosigue hasta obtener el número deseado de EPCs.

Las EPCs y la progenie de EPCs pueden ser criopreservadas por cualquier método conocido en esta materia hasta que son necesarias. (Véase, ej., Pat. USA N° 5.071.741, solicitudes de patente internacional PCT W093/14191, W095/07611, W096/27287, W096/29862, y W098/14058, Karlsson et al., 65 Biophysical J. 2524-2536 (1993)). Las EPCs pueden ser suspendidas en una solución isotónica, de preferencia un medio de cultivo celular, conteniendo un criopreservante determinado. Tales criopreservantes incluyen dimetil sulfuro (DMSO), glicerol y similares. Estos criopreservantes pueden utilizarse a una concentración del 5-15% (por ejemplo, 8-10%). Las células son congeladas gradualmente a una temperatura de -10° C a -150° C (por ejemplo, -20° C a -100° C, o -70° C a -80° C).

Dependiendo de las condiciones del cultivo, las EPCs pueden diferenciarse en células endoteliales o células de músculo liso. Las EPCs pueden diferenciarse en células endoteliales o células EPCs de músculo liso sobre un sustrato fijo, en un medio de cultivo con un factor de crecimiento inductor de diferenciación. La diferenciación de las EPCs puede inducirse también por cualquier método conocido en la materia, que active la cascada de eventos biológicos que conducen al crecimiento, lo que incluye la liberación de inositol trifosfato y Ca<sup>2+</sup> intracelular, liberación de diacil glicerol y la activación de proteína cinasa C y otras quinasas celulares, y similares. El tratamiento con esteroides de forbol, factores de crecimiento inductores de la diferenciación y otras señales químicas pueden inducir la diferenciación. En lugar de factores del crecimiento inductores de la proliferación, para la proliferación de EPCs (ver más arriba), se pueden añadir factores del crecimiento inductores de la diferenciación al medio de cultivo para influir en la diferenciación de las EPCs. Otros factores de crecimiento inductores de la diferenciación incluyen el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), hormona liberadora de tirotrópina (TRH), factor de crecimiento transformante beta (TGF $\beta$ s), factor de crecimiento tipo insulina (IGF-1) y similares.

Las células endoteliales diferenciadas o las células de músculo liso pueden ser detectadas utilizando técnicas inmunocitoquímicas conocidas habitualmente. La inmunocitoquímica (ej. métodos de inmunofluorescencia de etiquetado doble e inmunoperoxidasa) utiliza anticuerpos que detectan las proteínas celulares, para distinguir las características celulares o propiedades fenotípicas de las células endoteliales o las células de músculo liso.

5 Entre los marcadores celulares para las células endoteliales se incluyen, por ejemplo, cadherina VE, CD144, CD141, CD 106, o CD142, mientras que los marcadores celulares para las células de músculo liso incluyen del Flk. También puede utilizarse la inmunocitoquímica para identificar las células endoteliales, detectando la expresión de genes de células endoteliales tales como CD31 y e-NOS.

10 Puede realizarse también histoquímica de hibridación *in situ*, utilizando sondas de cDNA oRNA específicas para el gene endotelial mRNAs. Esas técnicas pueden combinarse con métodos inmunocitoquímicos, para mejorar la identificación de fenotipos específicos. Si es necesario, se pueden aplicar los anticuerpos y las sondas moleculares comentadas más arriba a procedimientos de Western y Northern blot respectivamente, para ayudar en la identificación celular.

15 Se pueden obtener células endoteliales, por ejemplo, de uno de los muchos depósitos de material biológico del mundo. Véase, por ejemplo, la American Type Culture Collection (ATCC.org en internet) o la International Depository Authority of Canada (IDAC; nml-Imm.gc.ca en internet). Las células endoteliales o las células progenitoras endoteliales pueden obtenerse también del individuo que será el receptor de la matriz tisular u orgánica trasplantada. Estas células se consideran autólogas respecto al receptor. Adicionalmente, en determinadas circunstancias, la relación entre la matriz tisular u orgánica y las células endoteliales o las células

20 progenitoras endoteliales puede ser alogénica (es decir, individuos distintos de la misma especie); en otros casos, la relación entre la matriz tisular u orgánica y las células endoteliales o las células progenitoras endoteliales puede ser xenogénica (es decir, individuos de distintas especies). En determinados casos, la matriz tisular u orgánica es xenogénica respecto al receptor, y las células endoteliales o progenitoras endoteliales son alogénicas respecto al receptor.

25 Una composición que incluye células endoteliales o células progenitoras endoteliales, es suministrada típicamente a una matriz tisular u orgánica en una solución que es compatible con las células (ej., en una composición fisiológica) en condiciones fisiológicas (ej., 37°C). Una composición fisiológica, como la comentada aquí, puede incluir, sin limitación, tampones, nutrientes (ej., azúcares, hidratos de carbono), enzimas, medio de expansión y/o diferenciación, citocinas, anticuerpos, represores, factores de crecimiento,

30 soluciones salinas, o proteínas derivadas del suero. Como se aplica aquí, una composición "compuesta esencialmente por células endoteliales o células progenitoras endoteliales, es una composición que carece básicamente de células distintas a las células endoteliales o las células precursoras endoteliales, pero puede seguir incluyendo cualquiera de los componentes que pueden encontrarse en una composición fisiológica (ej., tampones, nutrientes, etc.).

35 Para optimizar la reendotelización, las células endoteliales o progenitoras endoteliales son introducidas generalmente en una matriz orgánica o tisular por perfusión. Como con la perfusión precelular, y como se describe en WO 2007/025233, la perfusión se produce vía la vasculatura o la estructura tipo vasculatura (ej., otros lúmenes o conductos) de la matriz orgánica o tisular. La perfusión para reendotelizar una matriz orgánica o tisular debe realizarse a una velocidad de flujo que sea suficiente para que circule la composición fisiológica

40 de células por la vasculatura y las estructuras tipo vasculatura; no obstante, la perfusión para reendotelizar una matriz tisular u orgánica se realiza típicamente bajo escasa o ninguna presión (ej., menos presión de la aplicada en la fase de perfusión precelular para expandir y lavar el lecho vascular). La perfusión con las células endoteliales o células progenitoras endoteliales puede ser multidireccional (ej., anterógrada o retrógrada) para optimizar aún más la reendotelización.

45 El número de células endoteliales o células progenitoras endoteliales que se introduce en una matriz tisular u orgánica para la reendotelización depende del órgano o tejido (ej., qué órgano o tejido, el tamaño y el peso del órgano o tejido, el estadio de desarrollo del órgano o tejido, y/o la extensión de la vascularización del órgano o tejido), y el tipo y estadio de desarrollo de las células endoteliales, endoteliales derivadas, células endoteliales inmaduras, o células progenitoras endoteliales. Además, se puede perfundir en una matriz orgánica o tisular

50 más de un tipo de células endoteliales o progenitoras endoteliales (ej., un cóctel de células endoteliales o células progenitoras endoteliales). Distintos tipos de células endoteliales o células progenitoras endoteliales pueden presentar distintas tendencias en cuanto a la densidad de población que alcanzarán esas células, y de forma similar, distintas matrices orgánicas o tisulares pueden ser reendotelizadas a distintas densidades. Simplemente a guisa de ejemplo, por lo menos unas 100 (ej., por lo menos unas  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  o  $10^{10}$ ) células endoteliales o células progenitoras endoteliales pueden ser introducidas en una matriz orgánica o

55 tisular.

60 Previamente a la implantación, la matriz o el injerto deben contener una mayoría de células endoteliales maduras, como se define por la expresión de marcadores celulares para células endoteliales incluyendo, por ejemplo, cadherina VE, CD144, CD141, CD 106, o CD142. También puede utilizarse inmunocitoquímica para identificar las células endoteliales, detectando la expresión de genes de células endoteliales tales como CD31 y e-NOS. Un método no destructivo de aislamiento endotelial sería la perfusión breve de tripsina (0,25% o menos) u otro método de separación celular para permitir la eliminación de una pequeña fracción <0,01% de

las células endoteliales, que pueden ser ensayadas entonces respecto a la expresión de marcadores de células endoteliales incluyendo, pero sin limitación, CD 105, CD31 y expresión funcional de e-NOS. Una función adicional de las células endoteliales puede ser evaluada mediante la formación de tubos endoteliales en ensayos Matrigel. Resumiendo, los pocillos de una placa de 96 pocillos se recubrieron con 50  $\mu$ L de Matrigel™ helada, seguido de incubación a 37°C durante una hora. A continuación, 100  $\mu$ L de medio EGM-2, conteniendo aproximadamente de 25.000 a 50.000 células endoteliales, se añaden al Matrigel™. La incubación se lleva a cabo durante 16 horas, en una atmósfera humidificada a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>. La formación de tubos se evalúa con un microscopio invertido y se toman microfotografías digitales de cada pocillo individual con una ampliación de cuatro aumentos, y se puede calcular el número total de tubos, los puntos de ramificación, la longitud de los tubos y la suma de las longitudes de los tubos para cada pocillo, donde la presencia de tubos endoteliales definía células endoteliales funcionales.

Además, la medición de la reendotelización puede completarse mediante el uso de tests y ensayos estándar de hemocompatibilidad incluyendo, pero sin limitación, activación plaquetaria, ruptura oxidativa, hemólisis, fibrinólisis, formación de fibrina, generación de trombina, activación de contacto y activación del complemento. Los métodos no destructivos incluyen el uso de un ensayo de proliferación como CellTiter Blue, u otros ensayos metabólicos para determinar la densidad de células endoteliales presentes en la matriz, que puede ser extrapolada a valores conocidos de tejido nativo, donde el objetivo es tener una densidad de células endoteliales >50% de un tejido nativo.

La medición de la reendotelización puede realizarse utilizando tests y ensayos estándar de hemocompatibilidad, incluyendo pero sin limitación, activación plaquetaria, ruptura oxidativa, hemólisis, fibrinólisis, formación de fibrina, generación de trombina, activación de contacto y activación del complemento. Los métodos no destructivos incluyen el uso de un ensayo de proliferación como CellTiter Blue u otros ensayos metabólicos para determinar la densidad de células endoteliales presentes en la matriz, que puede ser extrapolado a valores conocidos de tejido nativo, donde el objetivo es tener una densidad de células endoteliales >50% de un tejido nativo.

Las presiones de perfusión para la introducción de células endoteliales corresponden generalmente a las presiones de perfusión nativa de los tejidos u órganos de los que se ha derivado la matriz o el andamio, en un rango de +/- 300%, ya que la vasculatura es capaz de resistir presiones >300 mm Hg.

Una matriz tisular u orgánica reendotelizada como se describe aquí puede ser trasplantada a un receptor. Esa matriz tisular u orgánica reendotelizada presenta muy poca trombogénesis y muy poca inmunogenicidad. Esa matriz tisular u orgánica reendotelizada, una vez trasplantada, puede seguir siendo recelularizada *in vivo*. Tras el trasplante, esa matriz tisular u orgánica reendotelizada puede ser recelularizada *in vivo* (es decir, con células nativas del receptor). La recelularización *in vivo* puede incluir más reendotelización y/o recelularización con células distintas de células endoteliales o células progenitoras endoteliales (ej., células específicas de tejido u órgano, tales como hepatocitos, células epiteliales de conducto biliar, células madre, células progenitoras, células iPS, células mononucleares de médula ósea, células de músculo liso, cardiomiocitos, fibroblastos cardiacos, fibroblastos, células kuffner, células de músculo esquelético, células satélite, células parietales glomerulares renales, podocitos glomerulares renales, células de borde en cepillo tubulares proximales renales, células de segmento fino de asa de Henle, células de túbulo distal renal, células de conducto colector renal, neumocitos tipo I (recubriendo el espacio de aire de la célula pulmonar), células de conducto pancreático (células centroacinares), células beta, células islote, cell, células intercaladas, células de borde de cepillo intestinales (con microvellosidades), células de conducto estriado de glándula exocrina, células epiteliales de vesícula biliar, células principales epididimarias, células renales intersticiales y/o células basales epididimarias).

Opcionalmente, una matriz tisular u orgánica puede ser recelularizada *in vitro* con células distintas a las endoteliales o progenitoras endoteliales antes de que la matriz tisular u orgánica sea reendotelizada, o después de que la matriz tisular u orgánica sea reendotelizada. Como se utiliza aquí, las células "distintas a las endoteliales, endoteliales derivadas o células progenitoras endoteliales" se refiere a todos los otros tipos de células que pueblan un tejido u órgano concretos. En los métodos que se describen aquí, se pueden utilizar células madre, o células progenitoras (ej., células madre embrionarias (ESC), células madre adultas, o madre pluripotentes inducidas (iPS)) para recelularizar el parénquima de un tejido u órgano, o se pueden usar células específicas de tejido u órgano (es decir, células diferenciadas o parcialmente diferenciadas) para recelularizar el parénquima de un tejido u órgano. Con células específicas de tejido u órgano, el tipo concreto de células suministradas depende típicamente del tipo de tejido u órgano que se produce en última instancia. Por ejemplo, al recelularizar un corazón se pueden introducir en o sobre la matriz tisular u orgánica cardiocitos, células de músculo liso, fibroblastos cardiacos y/o células madre cardiacas; al recelularizar un hígado se pueden introducir en o sobre la matriz tisular u orgánica hepatocitos, células de conducto biliar, células de músculo liso, fibroblastos y/o células progenitoras de hepatocitos; al recelularizar un riñón, se pueden introducir en o sobre la matriz tisular u orgánica podocitos, células glomerulares y/o células epiteliales; al recelularizar un pulmón se pueden introducir en o sobre la matriz tisular u orgánica células epiteliales, células claras, células caliciformes células alveolares tipo I y/o células alveolares tipo II; al recelularizar un páncreas, se pueden introducir en o sobre la matriz tisular u orgánica células beta y/o células islote.

- Al igual que con las células endoteliales o las células progenitoras endoteliales, se pueden suministrar células distintas a las endoteliales o progenitoras endoteliales a una matriz tisular u orgánica en una composición fisiológica (ej., con tampones, nutrientes, enzimas, medio de crecimiento o diferenciación), y pueden ser suministradas o introducidas utilizando diversas vías (ej., inyección (ej., en múltiples localizaciones), perfusión, infusión y/o aplicación tópica).
- En realizaciones en las que se introducen células distintas de la endoteliales o progenitoras endoteliales tras la reendotelización de la matriz tisular u orgánica, puede ser beneficioso conceder a las células endoteliales o las células progenitoras endoteliales algún tiempo para adherirse y establecerse dentro de la vasculatura de la matriz tisular u orgánica, antes de suministrar otras células. Tiempo suficiente para que las células endoteliales o las células progenitoras endoteliales se adhieran a la matriz tisular u orgánica es, por ejemplo, de 30 a 180 minutos. No obstante, se puede permitir a las células endoteliales o las células progenitoras endoteliales adherirse y establecerse en la matriz tisular u orgánica durante, por ejemplo, hasta 28-30 días (ej., aproximadamente 1 mes).
- En una realización, un injerto o lóbulo hepático descclularizado es reendotelizado con células endoteliales sinusoidales arteriales, venosas y/o hepáticas para crear un injerto hepático trasplantable que pueda ser trasplantado y anastomosado al suministro hepático de sangre nativa. El injerto hepático es recelularizado naturalmente *in vivo* mediante la migración de células del hígado adyacente.
- En otra realización, un injerto o lóbulo hepático descclularizado es reendotelizado con células endotelialesarteriales, venosas y/o sinusoidales hepáticas, para crear un injerto hepático trasplantable que pueda ser trasplantado y anastomosado al suministro hepático de sangre nativa. Tras el trasplante, otras células son perfundidas vía la vasculatura del paciente, o inyectadas en el intersticio del injerto hepático, como hepatocitos (autólogas, alogénicas, células madre derivadas o iPs derivadas).
- En otra realización, un injerto o lóbulo hepático descclularizado se reendoteliza primero y después se le inyectan hepatocitos para crear un injerto hepático trasplantable que pueda ser trasplantado y anastomosado al suministro hepático de sangre nativa.
- En otra realización, un injerto o parche cardiaco descclularizado es reendotelizado para crear un injerto cardiaco trasplantable que pueda ser trasplantado y anastomosado al suministro cardiaco de sangre nativa. El injerto es anastomosado y colocado sobre una región isquémica del corazón.
- En otra realización, un injerto o parche cardiaco descclularizado es reendotelizado para crear un injerto cardiaco trasplantable que pueda ser trasplantado y anastomosado al suministro cardiaco de sangre nativa. Tras el trasplante, otras células son perfundidas vía la vasculatura del paciente, o inyectadas en el intersticio del injerto cardiaco, como cardiomiocitos (autólogas, alogénicas, células madre derivadas o iPS derivadas).
- En otra realización, un injerto o parche cardiaco descclularizado es reendotelizado para crear un injerto cardiaco trasplantable que pueda ser trasplantado y anastomosado al suministro cardiaco de sangre nativa. El tejido isquémico del corazón es eliminado y el injerto reendotelizado es anastomosado e implantado quirúrgicamente.
- En otra realización, un injerto o parche cardiaco descclularizado se reendoteliza primero y luego se le inyectan cardiomiocitos para crear un injerto cardiaco trasplantable que pueda ser trasplantado y anastomosado al suministro cardiaco de sangre nativa. El tejido isquémico del corazón es eliminado y el injerto contráctil es anastomosado e implantado quirúrgicamente.
- En una realización, un injerto o lóbulo pulmonar descclularizado es reendotelizado con células endoteliales para crear un injerto pulmonar trasplantable que pueda ser trasplantado y anastomosado en el suministro hepático de sangre nativo. El injerto pulmonar es recelularizado naturalmente *in vivo* mediante la migración de células desde el tejido pulmonar adyacente.
- En otra realización, un injerto o lóbulo pulmonar descclularizado es reendotelizado con células endoteliales arteriales, venosas y/o sinusoidales hepáticas, para crear un injerto pulmonar trasplantable que pueda ser trasplantado y anastomosado al suministro hepático de sangre nativa. Tras el trasplante, otras células son perfundidas vía la vasculatura del paciente, o inyectadas en el intersticio del injerto en el injerto pulmonar, como son células epiteliales pulmonares (autólogas, alogénicas, células madre derivadas o iPS derivadas).
- En una realización, un injerto o lóbulo renal descclularizado es reendotelizado con células endoteliales para crear un injerto renal trasplantable que pueda ser trasplantado y anastomosado al suministro hepáticode sangre nativa. El injerto pulmonar es recelularizado naturalmente *in vivo* mediante la migración de células del riñón adyacente.
- En otra realización, un injerto o lóbulo renal descclularizado es reendotelizado con células endoteliales, para crear un injerto hepático trasplantable que pueda ser trasplantado y anastomosado al suministro renal de sangre nativa. Tras el trasplante, otras células son perfundidas vía la vasculatura de los pacientes, o inyectadas en el intersticio del injerto en el injerto renal, como células tubulares renales (autólogas, alogénicas, células madre derivadas o iPS derivadas).

En una realización, un injerto o lóbulo pancreático descelularizado es reendotelizado con células endoteliales, para crear un injerto pancreático trasplantable que pueda ser trasplantado y anastomosado al suministro hepático de sangre nativa. El injerto pulmonar es recelularizado naturalmente *in vivo* mediante la migración de células desde el páncreas adyacente.

- 5 En otra realización, un injerto o lóbulo pancreático descelularizado es reendotelizado con células endoteliales, para crear un injerto hepático trasplantable que pueda ser trasplantado y anastomosado al suministro pancreático de sangre nativa. Tras el trasplante, otras células son perfundidas vía la vasculatura del paciente, o inyectadas en el intersticio del injerto en el injerto pancreático, como células beta (autólogas, alogénicas, células madre derivadas o iP derivadas).
- 10 En una realización, el material inicial es un lóbulo hepático descelularizado por perfusión. En otra realización, el material inicial es parte de un lóbulo hepático descelularizado por perfusión. En otra realización, el material inicial es un injerto cardiaco descelularizado por perfusión, aislado del ventrículo izquierdo. En otra realización, el material inicial es un injerto cardiaco descelularizado por perfusión, aislado del ventrículo derecho. En otra realización, el material inicial es un injerto pulmonar descelularizado por perfusión aislado de un lóbulo pulmonar. En otra realización, el material inicial es un lóbulo pulmonar descelularizado por perfusión. En otra realización, el material inicial es un riñón descelularizado por perfusión. En otra realización, el material inicial es un injerto renal descelularizado por perfusión, aislado de una porción del riñón. En otra realización, el material inicial es un páncreas descelularizado por perfusión. En otra realización, el material inicial es un injerto pancreático descelularizado por perfusión aislado de una porción del páncreas
- 20 Como se indica aquí, los métodos de recelularización que se describen, y que resultan en una extensa reendotelización de la matriz tisular u orgánica, producen una matriz tisular u orgánica que, al ser trasplantada a un receptor, presenta muy escasa trombogenicidad. Dicha matriz tisular u orgánica reendotelizada presenta también una muy baja inmunogenicidad, en base a la cantidad de inflamación observada en el tejido u órgano trasplantado y/o la respuesta inflamatoria del receptor tras el trasplante.
- 25 De acuerdo con la presente divulgación, se pueden utilizar técnicas convencionales de biología, microbiología y bioquímica moleculares y de DNA recombinante conocidas por los expertos. Tales técnicas son ampliamente expuestas en la literatura. La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de los métodos y composiciones de materia descritos en las reivindicaciones.

## EJEMPLOS

### 30 Ejemplo 1—Animales

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con laUS Animal Welfare Act, y fueron aprobados por el Institutional Animal Care and Use Committee de la Universidad de Minnesota. Las matrices cardiacas se derivaron de ratas Sprague Dawley (250- 319 g) o Fisher 344 (196-296 g). En estudios de trasplantes se usaron matrices de Fisher 344. Todas las ratas utilizadas en la generación de andamios cardiacos fueron anestesiadas con 100 mg de etamina por kg de peso corporal (Phoenix Pharmaceutical) and 10 mg de xilacina por kg de peso corporal (Phoenix Pharmaceutical) seguido de heparinización sistémica.

### Ejemplo 2—Descelularización de corazones cadavéricos de rata

Corazones cadavéricos de rata fueron descelularizados siguiendo métodos publicados previamente (Ott et al., 2008; *Nature Med.*, 14(2):213-21). Resumiendo, las ratas fueron anestesiadas. A continuación, se realizó 40 esternotomía media, seguida de disección del pericardio y extracción del cuerpo graso retroesternal, para dejar expuestos los vasos mediastínicos. Las tres primeras ramas de la aorta torácica ascendente y ambas venas cava superiores se ligaron y seccionaron. La vena cava inferior (IVC) y los vasos pulmonares (venas y arterias) fueron seccionados. El corazón aislado fue entonces extraído de la cavidad torácica, colocado en una placa petri conteniendo PBS, fue cateterizado y lavado con PBS. Entonces el corazón fue perfundido por gravedad 45 con 1% SDS seguido de lavados con agua desionizada, 1% Triton-X100 (Sigma), y PBS conteniendo antibiótico (100 U/ml penicilina, 100 U/ml estreptomina; Gibco).

### Ejemplo 3—Recelularización de andamios de corazón de rata

Se adquirieron células endoteliales aórticas de rata (RAECs) de Vec Technologies (Rensselaer, NY). En todos los experimentos fueron utilizadas RAECs entre los pasos 14 y 20. Las RAECs fueron cultivadas en frascos 50 T185 recubiertos con gelatina en MCDB-131 completo (Vec Technologies), y pasadas utilizando TrypLE Express (Invitrogen). Para la recelularización vía la aorta, se llevó a cabo perfusión aórtica retrógrada de suspensiones celulares en los andamios descelularizados; para las recelularizaciones vía la arteria braquiocefálica (BA), a construcciones bajo perfusión continua de medio aórtica retrógrada se infundieron células en la BA. A las construcciones recelularizadas vía IVC se les colocó un catéter en la IVC, seguido de perfusión de RAECs. En todas las construcciones se infundieron células a 10 millones de células por ml. A 55 menos que se especifique lo contrario, las construcciones fueron cultivadas con perfusión de mediocontinua vía la aorta (MCDB-131 completo) durante siete días en una incubadora de cultivo tisular. El depósito de medio fue inyectado de forma continua con carbógeno (5% CO<sub>2</sub> y 95% O<sub>2</sub>) mientras duró el experimento.

**Ejemplo 4—Marcaje celular**

En un subgrupo de estudios, las RAECs fueron marcadas con Dil o DiO el día de la recelularización. Resumiendo, el medio fue eliminado de una placa confluyente de RAECs, y sustituido por DPBS conteniendo 5  $\mu\text{M}$  SP-DilC<sub>18</sub> o SP-DiOC<sub>18</sub> (Invitrogen). Tras 5 minutos de incubación a 37°C, las placas fueron transferidas a un frigorífico e incubadas durante 15 minutos a 4°C. Las placas fueron lavadas entonces una vez con PBS y se dejó que se recuperaran durante 2 horas a 37°C en medio de cultivo, antes de aislarlas y proceder a la siembra de las construcciones. Al final del experimento, las construcciones fueron extraídas del biorreactor y visualizadas en un Stereo Discovery V20 Macro Stereo (Carl Zeiss Inc.), diseccionadas, colocadas en Slowfade (Invitrogen) y visualizadas en un microscopio 510 Meta Confocal (Carl Zeiss Inc.).

En otros estudios, las construcciones sembradas con RAECs fueron marcadas con Cell Tracker Green CMFDA (Invitrogen) el último día del cultivo (Día 7), eliminando el medio de cultivo completo y circulando CMFDA conteniendo DMEM (Cellgro) sin suero durante 45 minutos a 37°C. El medio conteniendo CMFDA fue sustituido entonces por MCDB-131 completo, y las construcciones incubadas durante 45 minutos. Las construcciones marcadas con CMFDA fueron extraídas entonces del biorreactor, diseccionadas colocadas en Slowfade (Invitrogen) y visualizadas en un microscopio 510 Meta Confocal (Carl Zeiss Inc.).

**Ejemplo 5—Histología y cuantificación de núcleos celulares/vasos**

El último día del cultivo, las construcciones fueron extraídas del biorreactor, seccionadas en cuatro vistas de eje corto distribuidas al azar desde la base al vértice, y luego incrustadas en parafina. Tras inclusión en parafina, seccionamiento y rehidratación, fueron teñidas con hematoxilina y eosina o Verhoeff van Gieson, siguiendo protocolos estándar. Las platinas fueron visualizadas con un microscopio invertido Nikon Eclipse TE200 (Fryer Co. Inc.). Para la cuantificación de núcleos, se montaron platinas no teñidas en Vectashield conteniendo DAPI (Vectorlabs), y se tomaron al azar 5 imágenes de alta potencia por sección. Entonces se cuantificaron los núcleos positivos DAPI y se normalizaron con el área tisular. Para la cuantificación del diámetro vascular se tomaron 5 imágenes de alta potencia distribuidas al azar de secciones teñidas con Verhoeff-van Gieson, y se procesaron como se ha descrito anteriormente. El diámetro fue calculado midiendo el diámetro de eje corto de vaso conteniendo células con software ImageJ (NIH). Toda la toma de imágenes fue realizada utilizando un microscopio invertido Nikon Eclipse TE200 (Fryer Co. Inc.).

**Ejemplo 6—Tinción inmunofluorescente**

Secciones de parafina fueron rehidratadas mediante cambios de xileno y alcoholes graduados. Las platinas fueron hervidas en 10 mM de tampón citrato con 0,05% Tween-20 a pH 6,0 durante 20 min. Se llevó a cabo el bloqueo con 3% BSA en PBS durante una hora. Anticuerpos primarios de PCNA, PECAM-1 (policlonal de conejo, Santa Cruz), vWF, eNOS, Calretinina, Vimentina (policlonal de conejo, Abcam), vWF (policlonal de cabra, Santa Cruz), FLK-1 (monoclonal de ratón, BD Bioscience), CD34, CD45, CD11b (monoclonal de ratón, Santa Cruz), alfaactina de músculo liso (monoclonal de ratón, Sigma), y CD8 (monoclonal de conejo Abcam), fueron diluidos a 10 ng / ml en PBS, e incubados durante la noche a 4°C. Las platinas fueron lavadas con tres cambios de PBS con 0,05% Tween-20 entre pasos. Anticuerpos secundarios apropiados conjugados con FITC o Texas Red (Jackson Immunoresearch) fueron diluidos 1:250 e incubados durante una hora. Las platinas fueron montadas con medio de montaje conteniendo DAPI, y visualizadas en un microscopio fluorescente Nikon Eclipse TE200.

**Ejemplo 7—Ensayo G6PDH**

El medio fue recogido diariamente del biorreactor y conservado a -20°C. El día del ensayo, las muestras fueron descongeladas y, siguiendo las instrucciones del fabricante, se cuantificó la actividad G6PDH utilizando el Vybrant Cytotoxicity Assay Kit (Invitrogen).

**Ejemplo 8—TUNEL**

Tras siete días de cultivo, las construcciones reendotelizadas fueron fijadas con formalina, cortadas en cuatro vistas de eje corto representativas, de la base al vértice, incrustadas en parafina y luego seccionadas. Se utilizó el sistema DeadEnd Colorimetric TUNEL (Promega) para teñir respecto al ADN mellado. Se siguieron las instrucciones del fabricante para muestras en parafina, con las siguientes modificaciones: después de que las muestras fueran desparafinizadas y rehidratadas con una serie de etanol, fueron sometidas a microondas durante 2 min en una solución tampón citrato de 10 mM (Trater et al., 1995, *Histochem. Cell Biol.*, 103(2): 157-60); y en lugar de utilizar peroxidasa de rábano conjugada a estreptavidina, las muestras fueron tratadas con una estreptavidina conjugada con DyLight 594 (Jackson ImmunoResearch). Las platinas fueron montadas con Vectashield conteniendo DAPI (Vectorlabs) y se visualizaron utilizando un microscopio invertido Nikon Eclipse TE200 (Fryer Co. Inc., Huntley, IL).

**Ejemplo 9—Ensayo de trombomodulina *in vitro***

El ensayo de trombomodulina fue adaptado de trabajos publicados previamente (Calnek & Grinnell, 1998, *Experimen. Cell Res.*, 238(1):294-8; Ibrahim & Ramamurthi, 2008, *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, 2(1):22-32). El último día del cultivo (día siete), las construcciones fueron lavadas tres veces con DMEM/F12 (Invitrogen) sin

rojo fenol, a una velocidad de flujo de 1 ml/min durante un total de 45 minutos. Cuatro mililitros de DMEM/F12 sin fenol rojo, conteniendo alfa trombina humana (0,1 NIH U/ml; Haematologic Technologies) y proteína C humana (12 Mg/ml; Haematologic Technologies) fueron circulados entonces de forma continua por las construcciones cardiacas, vía la aorta, durante 45 min a 1 ml/min. Por triplicado, 100 µl de medio fueron transferidos a una placa de 96 pocillos, se mezclaron con 50 µl de caldo de hirudina (12 ATU/ml; American Diagnostica) e incubados durante 5 min a 37°C. A cada pocillo que contenía muestra se añadieron 50 µl del sustrato S-2366 (concentración final 0,75 mM; Chromogenix) y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Se midió la absorbancia a 410 nm y 490 nm, utilizando un Spectra MAX 340 (Molecular Devices). La absorbancia relativa final fue calculada restando la absorbancia a 490 nm de 410 nm y luego se normalizó por controles de andamio acelular.

#### Ejemplo 10—Trasplante heterotópico

Las ratas receptoras, desnudas RNU (213-388 g) o Fisher 344 (278-351 g), fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (60 mg/kg de peso corporal, inyección intraperitoneal). Se utilizó una incisión en la línea media de la pared abdominal para descubrir la aorta descendente y la vena cava inferior. Se realizó una anastomosis de extremo a lado de la aorta ascendente y la arteria pulmonar izquierda del corazón del donante a la aorta abdominal y la vena cava de la rata receptora, con sutura 9-0 según Ono & Lindsey (Ono, 1969, *J. Thome. Cardiovasc. Surg.*, 57(2):225-9). Las ratas fueron preheparinizadas antes del trasplante, y los trasplantes de desnudos de solo matriz recibieron terapia anticoagulante continua (heparina sódica a 100 u.i. por kg de peso corporal dos veces el día del trasplante, 200 u.i. por kg de peso corporal, subcutáneo durante los 2 días siguientes) y Coumadin (0,25 mg/kg de peso corporal/día) en el agua de beber.

#### Ejemplo 11—Perfusión y distribución de células endoteliales aórticas de rata

Se exploraron tres métodos de recelularización para determinar la técnica óptima para el suministro de células endoteliales: (a) perfusión directa de las RAECs vía la aorta, (b) perfusión de células a través de la BA con flujo de medio por la aorta, o (c) un suministro combinado de células: primero vía IVC, seguido de una segunda infusión vía BA como se describe. Tras el suministro, las construcciones fueron cultivadas bajo perfusión aórtica retrógrada de medio durante una semana, antes de ser analizadas. Para comprobar la localización de las células y cuantificar la celularidad después de siete días de cultivo, se fijaron las construcciones, se seccionaron en 4 vistas de eje corto distribuidas de la base al vértice, se incrustaron en parafina, se tiñeron y se cuantificaron los núcleos positivos DAPI (Figure 1A). En cada método de suministro, las células fueron retenidas dentro de la construcción y forraron el lumen de los vasos. No se observó una diferencia estadísticamente significativa en el número de células endoteliales en la matriz al suministrar 20 millones de células vía la aorta o la BA (Figura 1A). No obstante, las células suministradas vía la aorta no alcanzaron una distribución uniforme por el corazón, sino que se localizaron en el vértice, mientras la base del corazón se mantenía acelular. Se observó un incremento estadísticamente significativo en la celularidad cuantificada al duplicar el número de células sembradas. La mayor celularidad se observó con construcciones sembradas por IVC y BA, que resultó estadísticamente significativo incluso comparado con una infusión por BA única del mismo número de células.

El marcaje de las RAECs con Dil y DiO antes de la recelularización confirmó la distribución uniforme de las células por la matriz cardiaca en las construcciones que fueron sembradas con células suministradas vía BA (Figura 1B-C) o IVC más BA (Figura 1D-E). De forma similar, tras la perfusión de RAEC IVC, (DiO positivas) se pudieron observar células en el corazón desde el vértice a la base. El examen de las construcciones con siembra de células marcadas con DiO y Dil reveló que, en la pared del ventrículo, podían observarse vasos recubiertos con células suministradas por una única vía (Figura 2A y B) (es decir, células suministradas por BA o IVC), o conteniendo células suministradas por ambas vías (Figura 2C). La superficie endocárdica del ventrículo izquierdo estaba predominantemente recelularizada con células suministradas en la BA, mientras que la superficie endocárdica del ventrículo derecho estaba recubierta con RAECs suministradas vía IVC (Figura 2D y E).

La histología (tinción de hematoxilina y eosina y Verhoeff- von Gieson) de las construcciones cultivadas durante siete días muestra que los vasos de diversos diámetros estaban recubiertos (Figura 3A-D), así como también los vasos arteriales elastina positivos, y vasos elastina negativos (Figura 3B y D). Estos resultados indicaron que las RAECs no presentan una preferencia vascular observable durante la recelularización y el posterior cultivo *in vitro*. La cuantificación del diámetro vascular dentro de la pared medioventricular reveló que el suministro combinado de células vía IVC y BA resultaba en un incremento estadísticamente significativo en el número de vasos pequeños (11 a 25 micrones de diámetro), respecto al suministro de RAECs solo por BA (Figura 3E). Al examinar las secciones apicales no se observó esta dependencia de la vía de suministro en la distribución del diámetro vascular.

#### Ejemplo 12—Supervivencia en cultivo de células endoteliales aórticas de rata

Para comprobar si la perfusión retrógrada era suficiente o no para mantener el fenotipo de las RAECs y evitar la muerte celular en construcciones recelularizadas, se emplearon tres ensayos distintos: (a) marcaje celular CMFDA al final del cultivo *in vitro*, (b) tinción TUNEL, y (c) cuantificación de la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) en el perfundido de la construcción durante un periodo de siete días. Las

construcciones fueron recelularizadas vía BA o IVC solo, se cultivaron durante siete días como se describe, y luego se marcaron con CMFDA. CMFDA fue utilizado porque solamente puede marcar y ser escindido por células viables. Tanto las células suministradas vía BA como las vía IVC fueron capaces de escindir CMFDA (Figura 4A-C) el día siete. Se marcaron las células endocárdicas que recubrían el ventrículo derecho (Figura 4C), indicando coronarias rudimentarias. El análisis TUNEL demostró que muy pocas RAECs, si había alguna, eran apoptóticas el día siete (Figura 4D-I), con independencia de la localización celular (LV, RV o tabique). Se cuantificó la actividad G6PDH como indicador de la muerte celular continua. No se observó incremento en el G6PDH mientras duró el experimento, con independencia del método de suministro celular (Figura 4J). Estos resultados indican que la perfusión aórtica es suficiente para mantener las RAECs en una construcción cardiaca recelularizada, con independencia de cómo fueron suministradas.

#### **Ejemplo 13—Análisis fenotípico *in vitro* de construcciones reendotelizadas**

Se examinó el fenotipo y la función de las RAECs por tinción inmunofluorescente de las células en las construcciones el día siete post recelularización. Pudieron observarse células PCNA<sup>+</sup> en las construcciones, sugiriendo que continuaba la proliferación (Figura 5A). Igualmente, pudieron observarse células eNOS<sup>+</sup> en el árbol vascular, lo que implica que las células se mantienen funcionales (Figura 5B). Finalmente, las RAECs expresaron el factor de Von Willebrand (Figura 5C), indicando el potencial de regulación de la coagulación. Para determinar si las construcciones reendotelizadas podían o no inhibir la vía de coagulación se realizó un ensayo de trombomodulina *in vitro* sobre el perfundido circulante por la construcción. Para ello, el día siete se hizo circular por las construcciones recelularizadas o los andamios acelulares una solución conteniendo trombina y proteína C. Se observó un incremento estadísticamente significativo de 6 a 8 veces de la actividad de la proteína C mediada por la trombomodulina y la trombina (Figura 5D). La proteína C es un regulador negativo de la cascada de la coagulación; por tanto, estos resultados indican que las construcciones recelularizadas pueden potencialmente inhibir la cascada de la coagulación, puesto que retienen la capacidad de activar la proteína C. Las construcciones recelularizadas BA y BA más IVC se comportaron de forma similar, aunque se observó una tendencia a un mejor comportamiento de las construcciones suministradas con células por BA más IVC.

#### **Ejemplo 14—Caracterización de explantes heterotópicos**

Andamios acelulares y construcciones de RAECs reendotelizadas por BA fueron trasplantados heterotópicamente en el abdomen de ratas receptoras. Antes del trasplante, las construcciones reendotelizadas fueron cultivadas durante siete días, para permitir la adhesión y el crecimiento de las RAECs. El día siete tras el trasplante, las construcciones fueron explantadas y examinadas (Figura 6). Un coágulo formado en el extremo de la aorta fue reducido en las construcciones recelularizadas (Figura 6A y E). El examen de la pared del LV y del ventrículo mostró una mayor trombogénesis en los trasplantes de andamio acelular, comparado con las construcciones reendotelizadas (Figura 6B y F). Se observó más sangre suelta en el parénquima de los andamios acelulares (Figura 6C y G), mientras se observaban vasos patentes llenos de sangre en las construcciones reendotelizadas (Figura 6D e I). La caracterización de células reclutadas por tinción inmunofluorescente (Tabla 1) mostró que muy pocas (menos del 4%) eran positivas respecto a marcadores de macrófagos (CD11b) o linfocitos (CD8). Además, marcadores de músculo liso (SMA), mesotelio (calretinina), progenitoras endoteliales (CD34), endoteliales (vWF) y fibroblastos (vimentina) fueron expresados solamente por un pequeño subconjunto de las células reclutadas (Tabla 1). La mayoría de las células reclutadas expresaron los marcadores celulares PECAM<sup>+</sup> y VEGFR2<sup>+</sup> con independencia de que la construcción hubiera sido recelularizada o no (Figura 7). No obstante, los marcadores de células progenitoras, CD34 y células madre hematopoiéticas (CD45), fueron expresados solamente por un pequeño subconjunto de las células reclutadas (Tabla 1).

Tabla 1

Marcador	Células positivas por campo de alta potencia	% de núcleos positivos DAPI
CD 11b	44,00	3,87
CD45	22,50	2,37
CD8	23,20	0,89
Calretinina	20,00	1,69
CD34	6,00	0,13
vWF	19,00	1,11
Vimentina	17,80	0,39
SMA	3,20	0,09

5 Debe entenderse que, aunque los métodos y composiciones de materia se han descrito aquí en conjunción con varios aspectos distintos, la precedente descripción de los diversos aspectos pretende ilustrar y no limitar el alcance de los métodos y composiciones de materia. Otros aspectos, ventajas y modificaciones quedan dentro del marco de las siguientes reivindicaciones.

10 Se divulgan métodos y composiciones que pueden ser utilizados para, ser usados conjuntamente con, ser usados en preparación de, o son productos de los métodos y composiciones divulgados. Esos y otros materiales son divulgados aquí, y se entiende que se divulgan las combinaciones, subconjuntos, interacciones, grupos, etc. de estos métodos y composiciones. Es decir, que aunque no se divulga explícitamente referencia específica a cada una de las diversas combinaciones y permutaciones individuales y colectivas de estas composiciones y métodos, todas son contempladas y descritas específicamente aquí. Por ejemplo, si se divulga y comenta una composición de materia determinada, o un método específico, y son comentados 15 diversos métodos y composiciones, se contemplan específicamente todas y cada una de las combinaciones y permutaciones de las composiciones y los métodos, a menos que se indique específicamente lo contrario. De modo similar, todo subconjunto o combinación de los mismos es también específicamente contemplado y divulgado.

20 Si bien en la especificación precedente esta invención se ha descrito en relación con determinadas realizaciones preferidas de ella, y se han dado muchos detalles a efectos de ilustración, resultará aparente para los técnicos en la materia que la invención es susceptible de realizaciones adicionales, y que algunos de los detalles descritos aquí pueden variarse considerablemente sin apartarse de los principios básicos de la invención como vienen definidos por las reivindicaciones.

25

**REIVINDICACIONES**

1. Un método *ex vivo* de recelularizar una matriz tisular u orgánica, comprendiendo los pasos de:
  - a) Proporcionar una matriz descelularizada de un órgano o tejido vascularizado de mamífero, donde dicha matriz de dicho órgano comprende una cápsula de órgano intacta, donde dicha matriz de dicho órgano o tejido comprende un sistema vascular, donde cuando se introduce fluido por un punto de entrada de dicho sistema vascular de dicha matriz descelularizada, sale por una vía diferente; y
  - b) Reendotelizar la matriz tisular u orgánica por perfusión, en direcciones antégrada y retrógrada, del sistema vascular descelularizado de la matriz tisular u orgánica, con una composición comprendiendo una población sustancialmente pura de células endoteliales o células progenitoras endoteliales.
2. El método de la reivindicación 1, donde las células endoteliales son seleccionadas del grupo compuesto por células endoteliales de la sangre, células endoteliales de médula ósea, células endoteliales circulantes, células endoteliales de aorta humana, células endoteliales microvasculares de cerebro humano, células endoteliales microvasculares dérmicas humanas, células endoteliales microvasculares intestinales humanas, células endoteliales microvasculares pulmonares humanas, células endoteliales microvasculares humanas, células endoteliales sinusoidales hepáticas, células endoteliales de vena safena humana, células endoteliales de vena umbilical humana, células endoteliales linfáticas, células endoteliales de microvaso, células endoteliales microvasculares, células endoteliales de arteria pulmonar, células endoteliales de capilar retiniano, células endoteliales microvasculares retinianas, células endoteliales vasculares, células endoteliales de sangre de cordón umbilical, células endoteliales sinusoidales hepáticas, células endoteliales unidades formadoras de colonias (CFU-ECs), células angiogénicas circulantes (CACs), precursoras endoteliales circulantes (CEPs), células formadoras de colonias endoteliales (ECFC), ECFC de bajo potencial proliferativo (LPP-ECFC), ECFC altamente proliferativas (HPP-ECFC), y combinaciones de las mismas.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, donde las células endoteliales o las células progenitoras endoteliales son células madre embriónicas (ESCs) o células madre pluripotentes inducidas (iPSCs), células endoteliales derivadas o células progenitoras endoteliales.
4. El método de la reivindicación 1, donde la matriz tisular u orgánica se origina a partir de un órgano seleccionado entre el grupo compuesto por corazón, riñón, hígado, pulmón, páncreas, intestino, músculo, piel, mama, esófago, tráquea u omento.
5. El método de la reivindicación 1, donde la matriz tisular u orgánica y las células endoteliales o las precursoras endoteliales son xenogénicas.
6. El método de la reivindicación 1, donde la matriz tisular u orgánica y las células endoteliales o las células precursoras endoteliales son alogénicas.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además la introducción de células distintas de las células endoteliales o progenitoras endoteliales en o sobre la matriz tisular u orgánica antes del paso b).
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además la introducción de células distintas de las células endoteliales o progenitoras endoteliales en o sobre la matriz tisular u orgánica tras el paso b).
9. El método de la reivindicación 7 u 8, donde las células distintas de las endoteliales o progenitoras endoteliales son introducidas en la matriz tisular u orgánica vía perfusión, inyección directa, aplicación tópica o combinaciones de lo anterior.
10. El método de cualquier reivindicación precedente, donde el paso de proporcionar una matriz descelularizada de un órgano o tejido vascularizado de mamífero comprende descelularización por perfusión del órgano o tejido vascularizado.

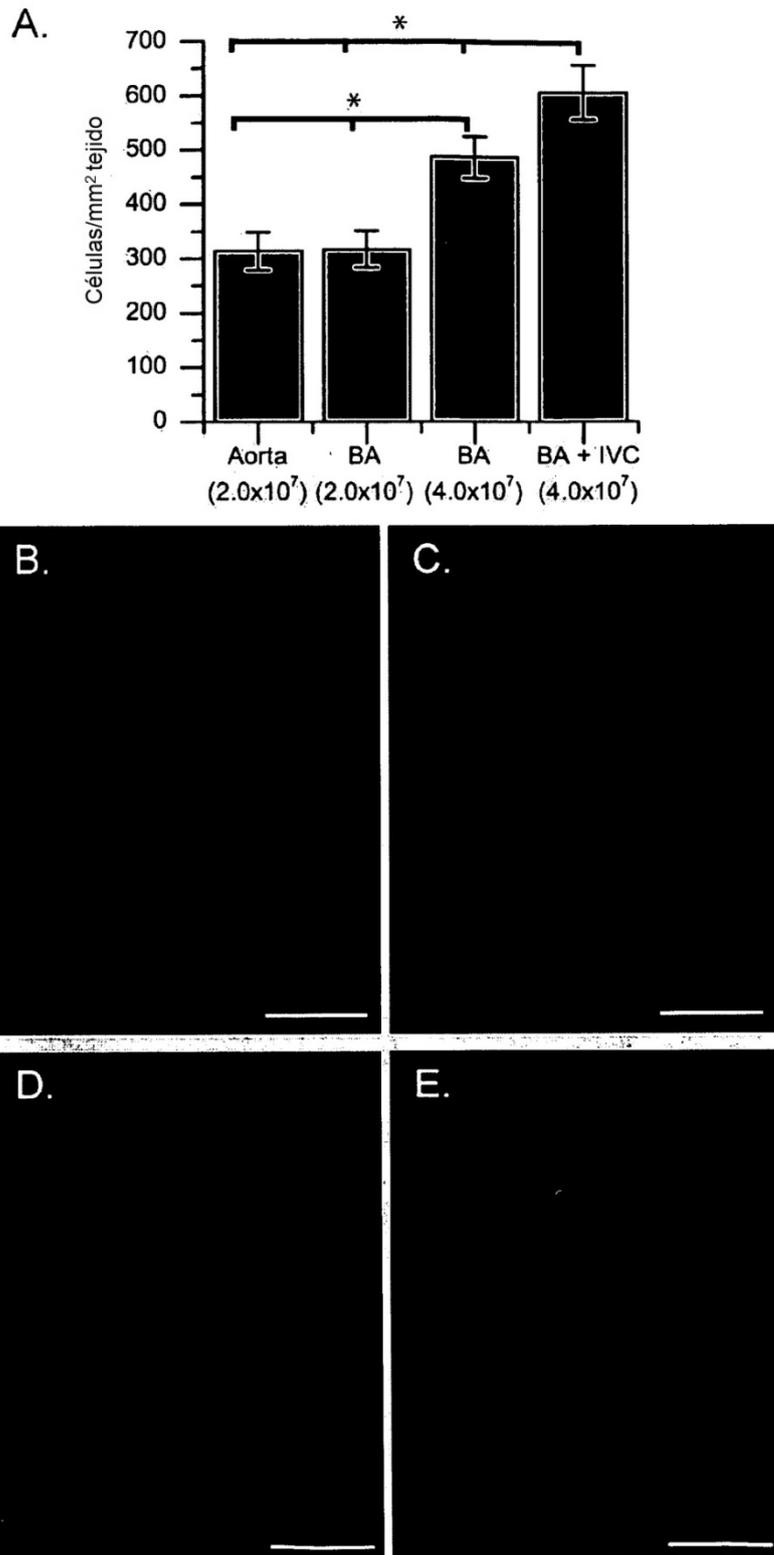


FIG 1

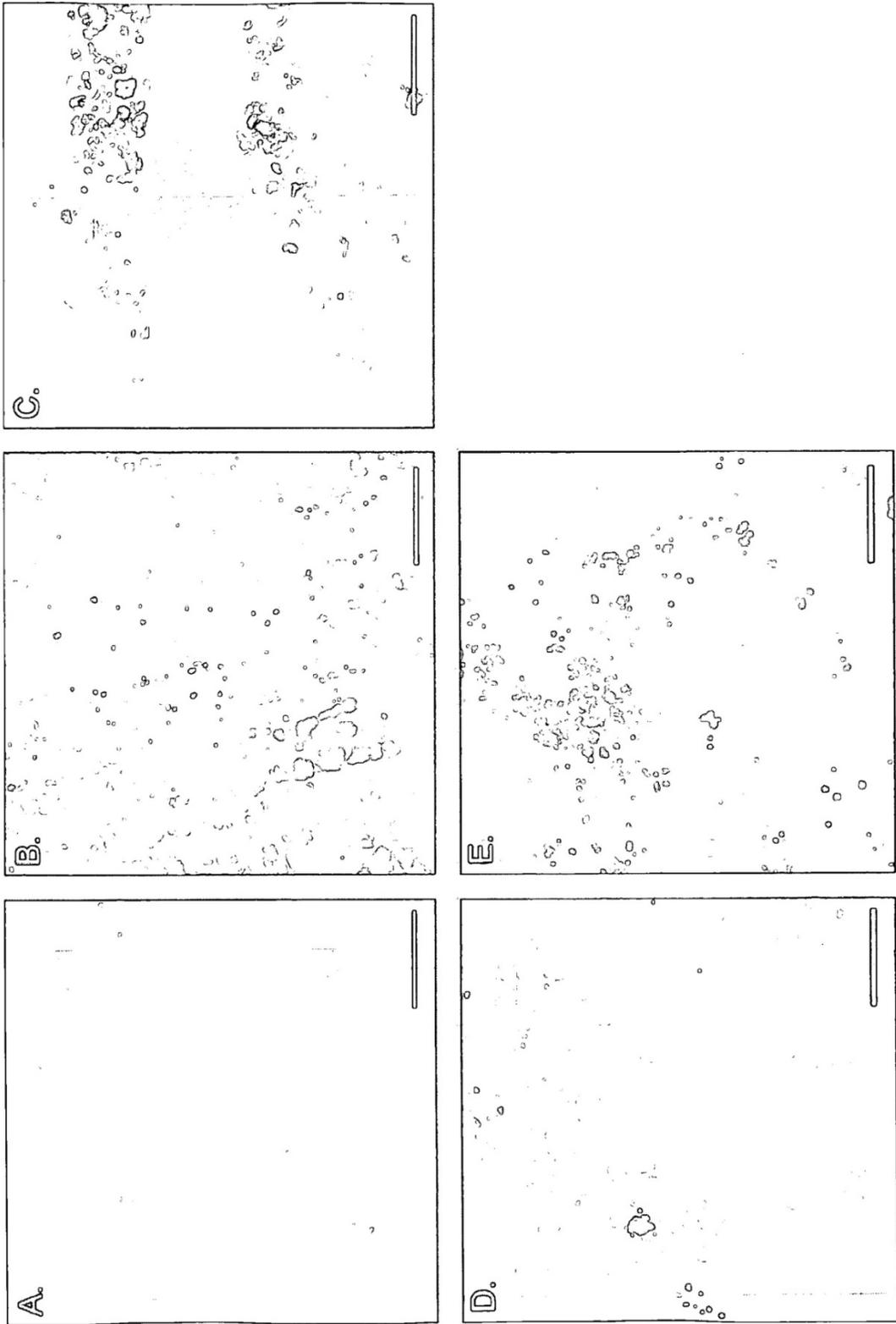


Figura 2

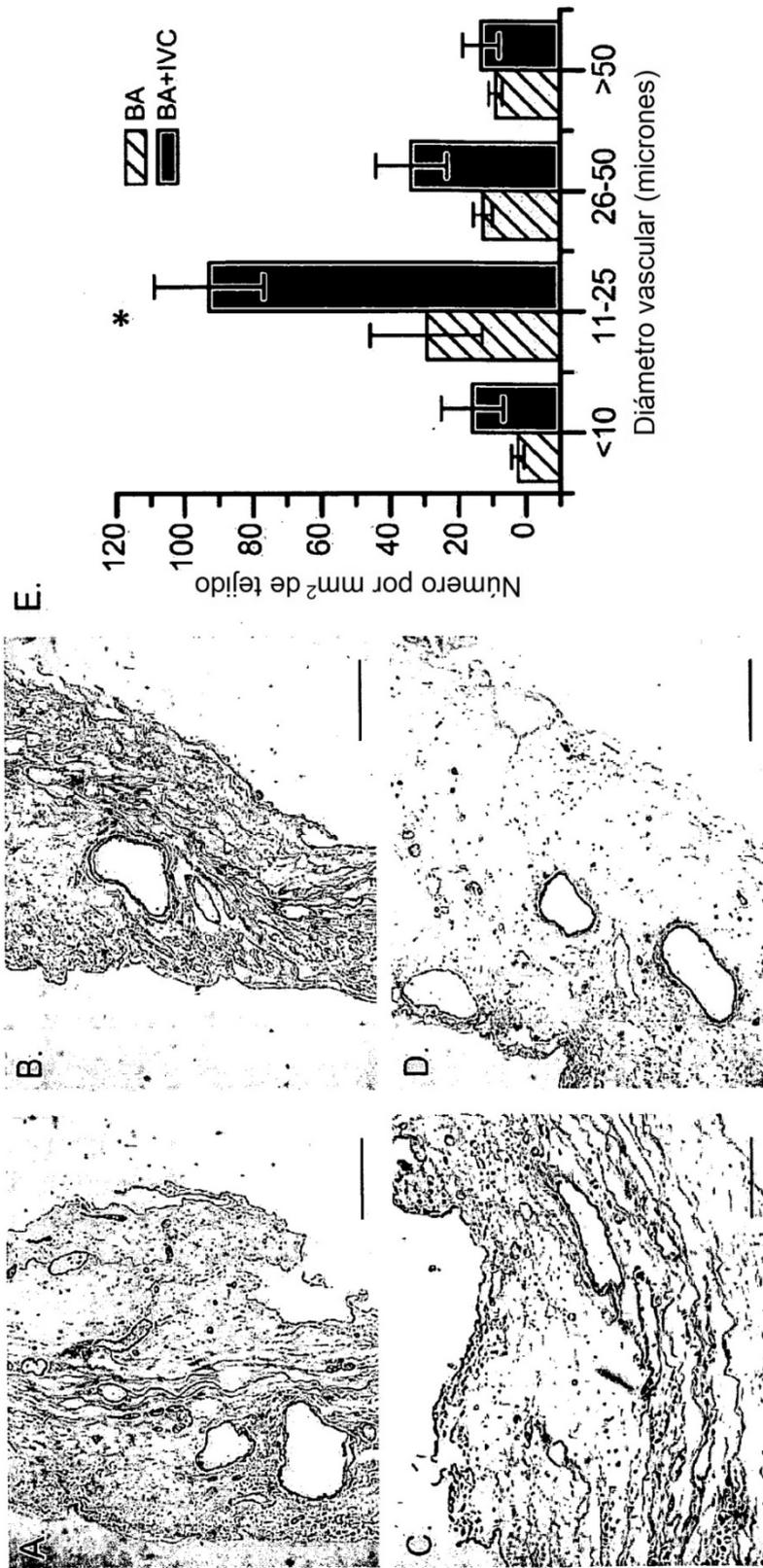


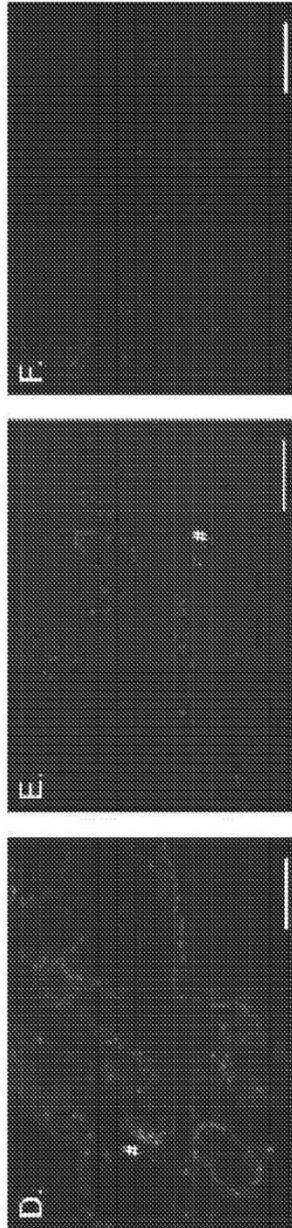
Figura 3



*Fig. 4C*

*Fig. 4B*

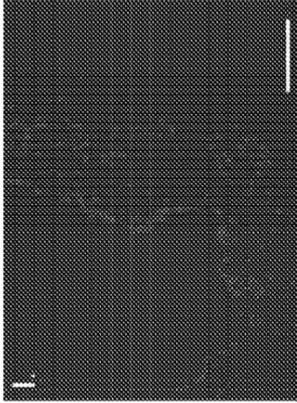
*Fig. 4A*



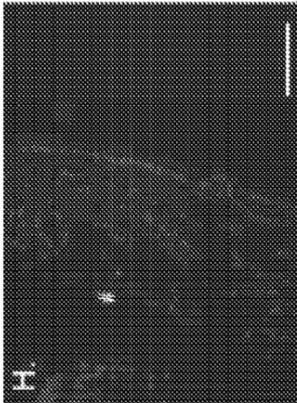
*Fig. 4F*

*Fig. 4E*

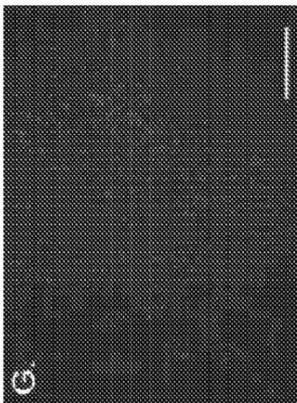
*Fig. 4D*



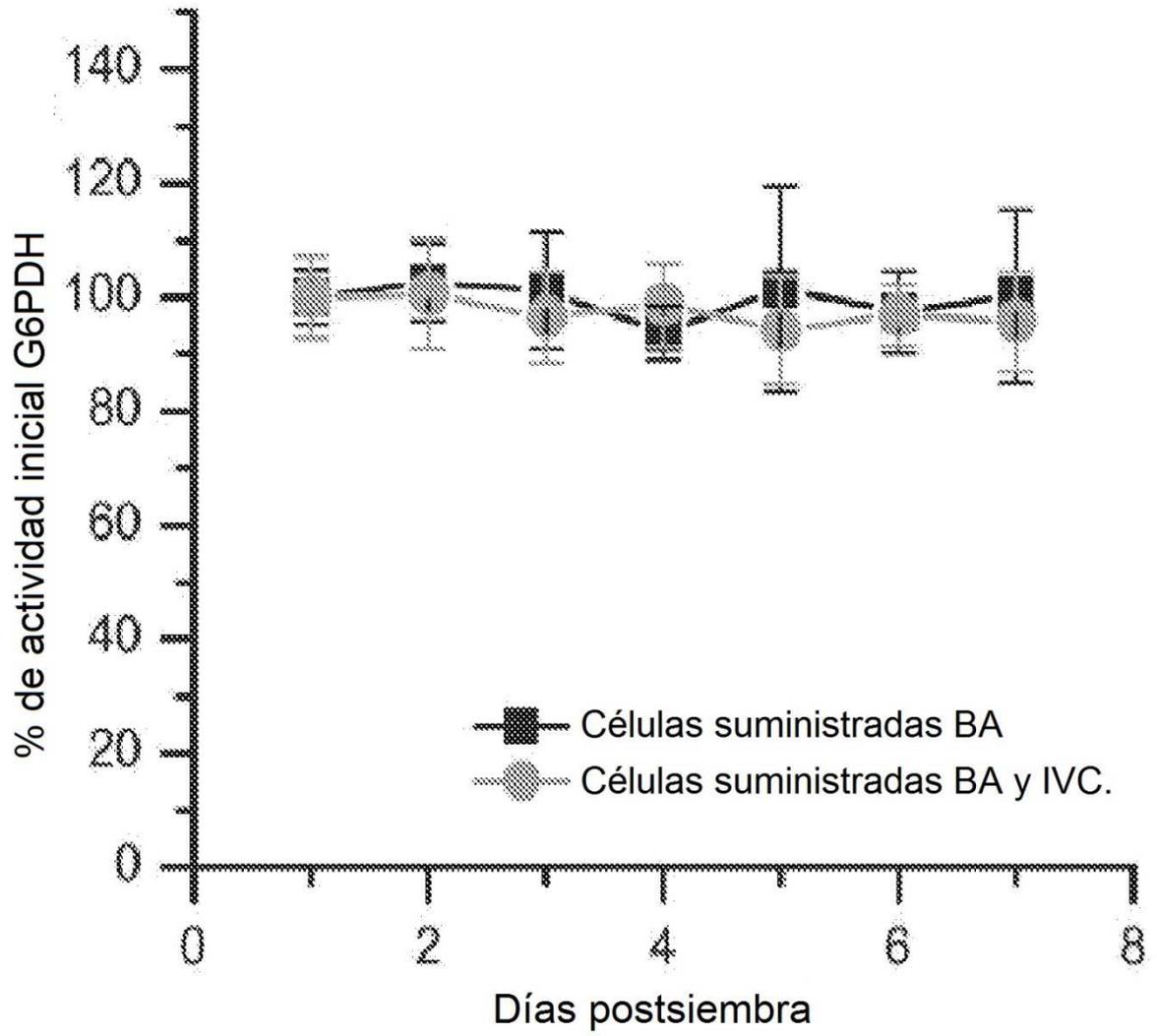
*Fig. 4I*



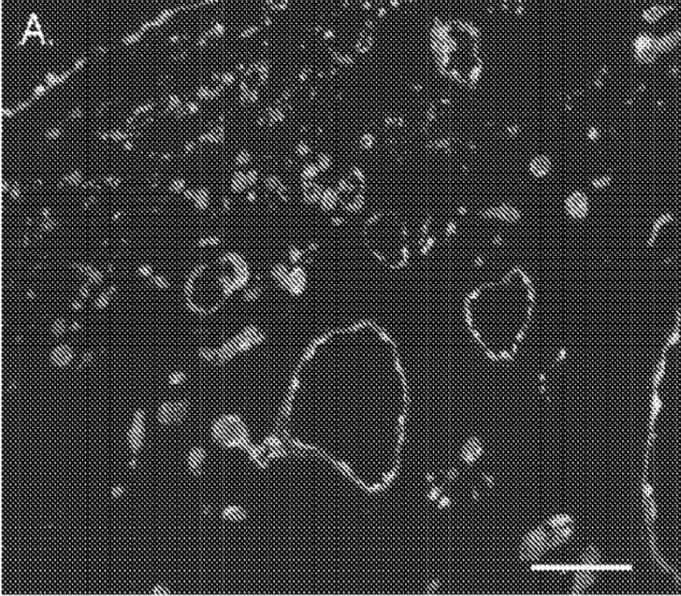
*Fig. 4H*



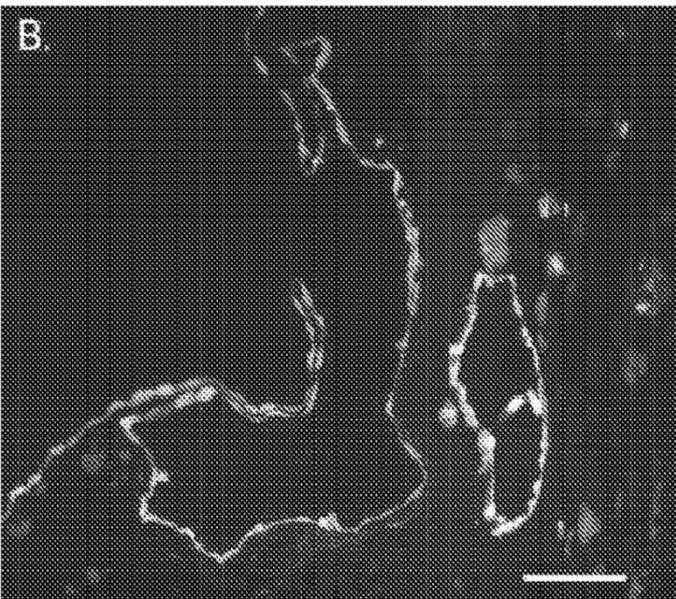
*Fig. 4G*



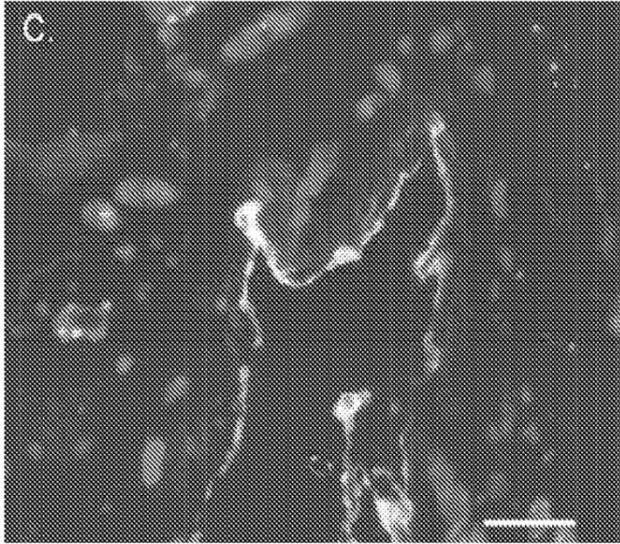
*Fig. 4J*



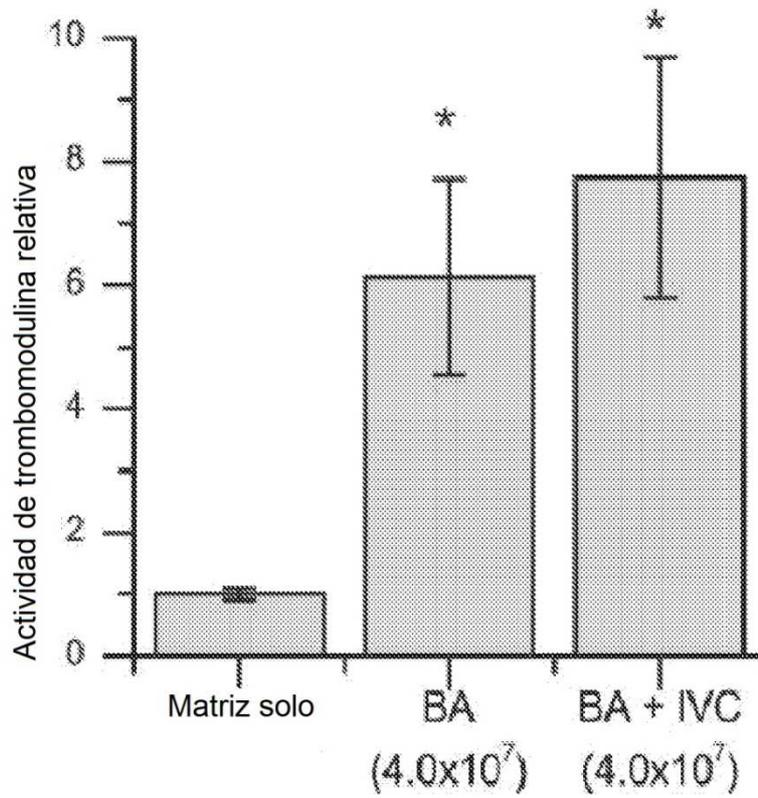
*Fig. 5A*



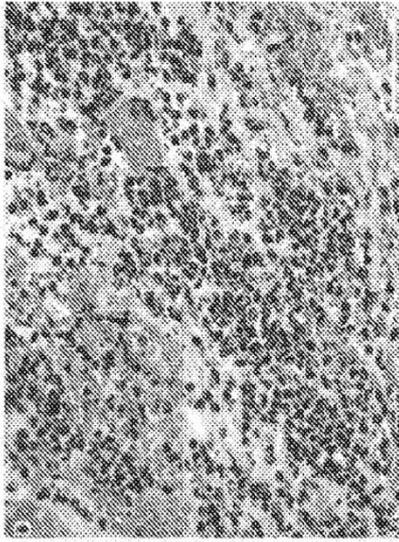
*Fig. 5B*



*Fig. 5C*



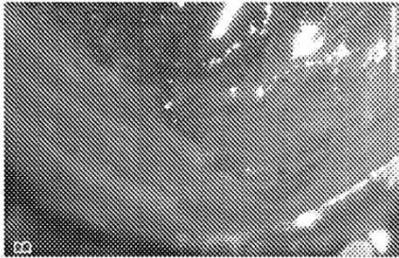
*Fig. 5D*



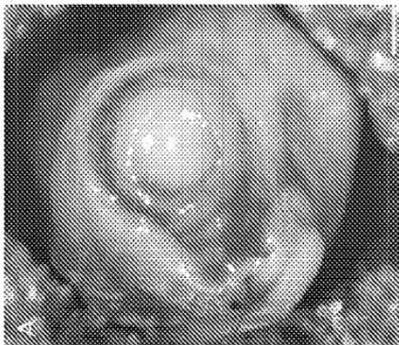
*Fig. 6D*



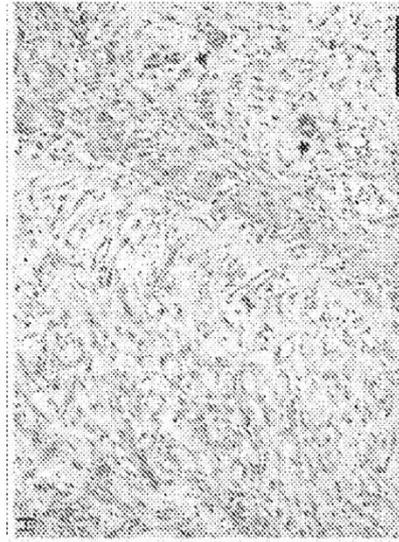
*Fig. 6C*



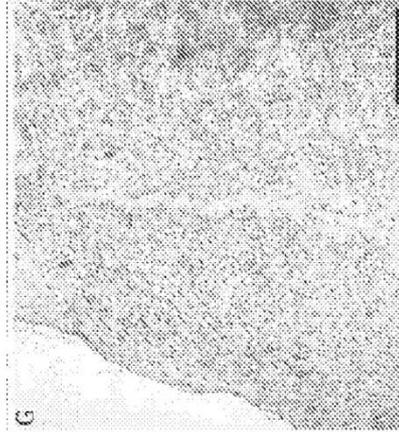
*Fig. 6B*



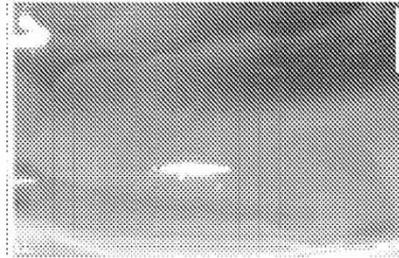
*Fig. 6A*



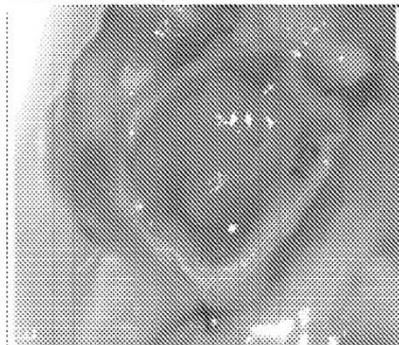
*Fig. 6H*



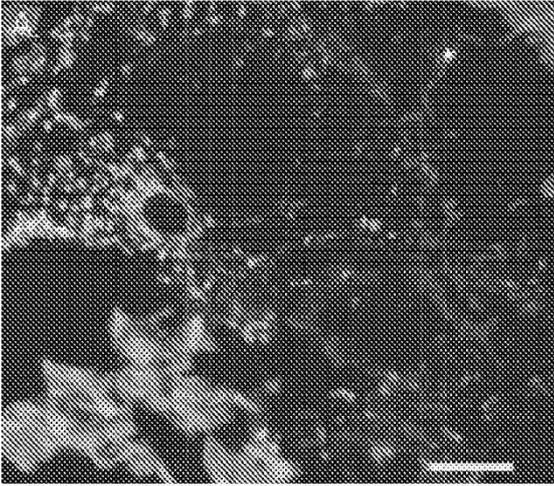
*Fig. 6G*



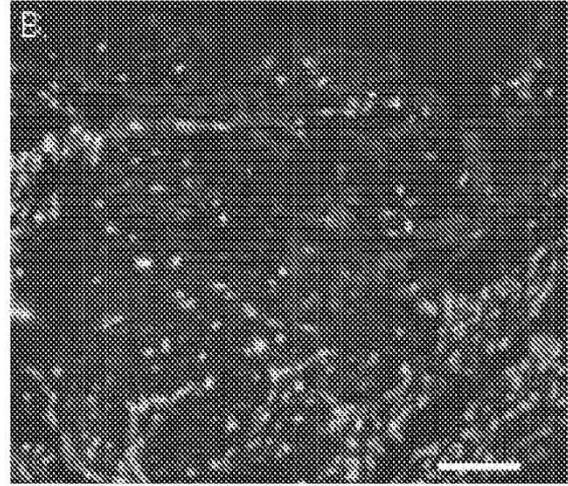
*Fig. 6F*



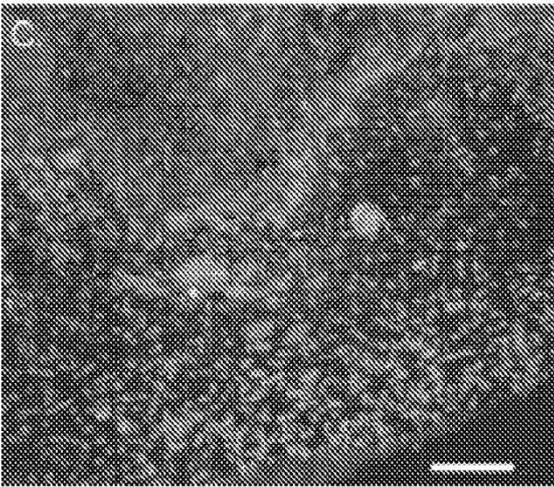
*Fig. 6E*



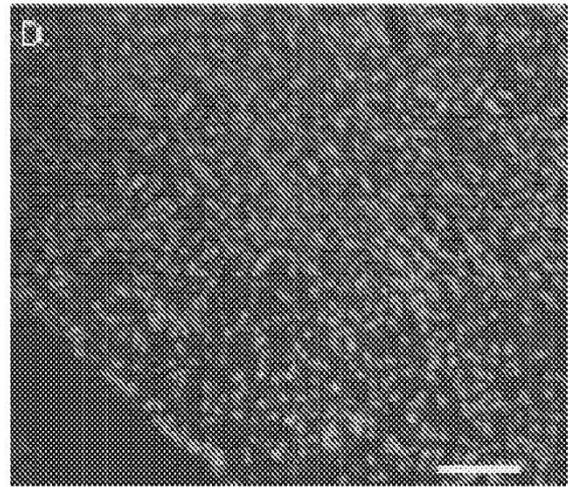
*Fig. 7A*



*Fig. 7B*



*Fig. 7C*



*Fig. 7D*