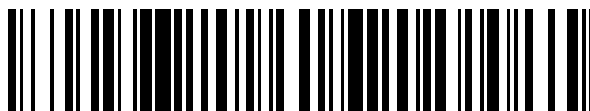


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 282**

51 Int. Cl.:

A61L 27/24 (2006.01)

A61L 27/56 (2006.01)

A61L 31/04 (2006.01)

A61L 31/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.06.2008 PCT/FR2008/000785**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.01.2009 WO09007531**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2008 E 08826154 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018 EP 2157983**

54 Título: **Soporte colágeno modificado mediante injertado covalente de moléculas de adhesión**

30 Prioridad:

13.06.2007 FR 0704209

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.04.2018

73 Titular/es:

**SCHUSSLER, OLIVIER (100.0%)
8 bis rue berthelot
92150 Suresnes, FR**

72 Inventor/es:

SCHUSSLER, OLIVIER

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 665 282 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

Soporte colágeno modificado mediante injertado covalente de moléculas de adhesión

5 La presente invención se refiere a soportes colágenos caracterizados porque están modificados químicamente mediante injertado covalente de moléculas de adhesión que facilitan la implantación de células, su supervivencia y su diferenciación. El soporte colágeno (denominado en lo sucesivo soporte o estructura principal; "scaffold" en inglés) se utiliza con células con capacidad potencial contráctil, pero pueden estar asociados también otros tipos de células como células con capacidad potencial angiogénica.

10 La invención trata igualmente del procedimiento de fabricación en el campo de la medicina/cirugía de un soporte colágeno tridimensional destinado a la terapia celular y/o la ingeniería de tejidos contráctiles y la utilización del soporte colágeno tridimensional en la realización de diferentes dispositivos del campo de la medicina/cirugía cardiotorácica y vascular.

15 La presente invención se refiere a sustratos colágenos revestidos, en particular de uso médico, para la reparación y la regeneración de tejidos.

20 El colágeno es un constituyente de numerosos dispositivos utilizados en terapia celular, para la ingeniería de tejidos y en el campo de la medicina/cirugía cardiotorácica y vascular. Estos dispositivos están destinados a ser implantados y celularizados y su funcionalidad es optimizada mediante una mejor interacción entre las células y los soportes.

25 El colágeno es mejorado mediante injertado covalente de moléculas de adhesión que pueden interaccionar así de forma óptica con los receptores de membranas de las células de interés (células asociadas o que van a colonizar el soporte). La activación de los receptores supone una cascada de acontecimientos que favorecen la adhesión, el crecimiento, la supervivencia, que controlan la apoptosis y la diferenciación celular.

30 La invención propone igualmente métodos más generales: 1) para mejorar la fijación de moléculas como moléculas de adhesión o agentes de grupos carboxilos, como es el caso para el colágeno, 2) para mejorar la biocompatibilidad de la estructura principal del colágeno mediante una reticulación llevando a cabo reacciones químicas que no conducen a productos tóxicos susceptibles de obstaculizar el crecimiento *in situ* de las células.

35 Actualmente las técnicas de regeneración de tejidos recurren a diferentes técnicas: a) el trasplante directo de células libres en los entornos deteriorados, b) técnicas de ingeniería de tejidos con desarrollo de tejido de sustitución a partir de células utilizadas en estructuras principales tridimensionales. La realización de estructuras principales para la terapia celular es difícil ya que es necesario que el soporte permita la libre difusión de los nutrientes y oxígeno, que posea propiedades mecánicas, pero también ligandos biológicos específicos le permitan interaccionar con las células de interés asociadas con el fin de favorecer además su supervivencia y su diferenciación. Además, este soporte debe favorecer la angiogénesis ya que no está vascularizado, contrariamente a los tejidos naturales. Este soporte debe ser biocompatible y provocar poca reacción inflamatoria después de la implantación *in vivo*. Finalmente, es necesario que este soporte pueda ser utilizado clínicamente, que sea compatible con la seguridad sanitaria y que excluya el empleo de un extracto tumoral. Hasta ahora estos soportes no existen para la ingeniería de un tejido cardiovascular y torácico.

45 Hasta hoy día, las técnicas de trasplante de células aisladas han mostrado limitaciones con una mortalidad celular muy considerable y a menudo con la ausencia de diferenciación de las células trasplantadas. Así se conoce por T. Yasuuda *et al.*¹ que el empleo de cardiomiocitos fetales, de mioblastos esqueléticos y células madre de médula ósea han tenido siempre un éxito limitado en su capacidad de reconstituir tejidos deteriorados y en la mejora de la función cardíaca. La falta de producción de nuevas fibras de miocardio en un número suficiente para que haya un efecto positivo en una aplicación clínica ha sido atribuida a la muerte muy considerable de células que se producen después del injerto (aproximadamente 90%) y a la incapacidad de la célula injertada para diferenciarse e integrarse en el miocardio^{1, 2}. La baja tasa de supervivencia de las células trasplantadas se ha indicado en varios trabajos que puede explicar la falta de éxito de las terapias celulares en las que las células son inyectadas aisladamente. Este problema de supervivencia es ilustrado por varios grupos que han mostrado que la modificación de células con genes de supervivencia podría mejorar considerablemente su supervivencia y su funcionalidad después del trasplante³.

60 Aún más precisamente, diferentes grupos han mostrado interés en asociar células a un soporte tridimensional que permitiría recrear el entorno del tejido nativo con trasplante de células en soportes sintéticos o biológicos como, por ejemplo, colágeno⁴⁻⁸. La destrucción de la matriz extracelular (ECM) nativa compuesta principalmente por colágeno de tipo I y III en el miocardio y su sustitución con un tejido de propiedades mecánicas alteradas (menos fiable), menos vascularizado y que, sobre todo, debido a una modificación de su composición no permite una interacción óptima, podría explicar los resultados bastante mediocres del trasplante de células libres. La presencia de una matriz colágena mejora por tanto significativamente la regeneración del tejido muscular⁹. La inyección de células por vía endovascular está en vías de evaluación para la regeneración del miocardio y podría tener un cierto interés¹⁰. Se

han realizado igualmente inyecciones de microesferas de colágeno por vía endovascular antes de inyectar células de tipo hepatocito en los mismos vasos o en zonas vascularizadas o de drenaje de estos vasos con el fin de favorecer la supervivencia¹¹. Pueden ser igualmente obtenidos geles o hidrogeles inyectables de colágeno asociando micropartículas de colágeno con partículas sintéticas como nanotubos de carbono¹² o polímeros naturales como quitosano.

La identificación de las características del microentorno que afecta al fenotipo celular y su función en una matriz de colágeno suministran las condiciones para la ingeniería de tejido de miocardio artificial dirigido a aplicaciones médicas^{13, 14}. En estos tejidos, este entorno 3D está constituido por la matriz extracelular que está constituida por proteínas. Una de las principales proteínas estructurales de este entorno es el colágeno¹⁵. Las células interactúan con este entorno por medio de receptores de superficie denominados “integrinas” que reconocen las secuencias elementales lo más frecuentemente de péptidos y que están presentes en las proteínas de la ECM^{13, 16}. Se trata de receptores heterodímeros de transmembrana formados mediante asociación de una cadena alfa y una cadena beta. La activación de estos receptores dependerá de la presencia del ligando sobre la ECM pero también de la presentación de este ligando de las posibilidades de reagrupar los diferentes receptores. La activación del receptor de la molécula o de la secuencia péptida de adhesión, el receptor integrínico, es responsable de una cascada de acontecimientos intracelulares con reagrupaciones del citoesqueleto de la célula, activación de diferentes vías de señalización que controlan la supervivencia^{17, 18}, la forma¹⁹, la proliferación, la apoptosis¹⁷ o la diferenciación celular^{20, 21}. Para que esta activación se produzca de forma óptima, es necesario no solamente que el ligando esté presente en la ECM, sino que este ligando esté presente correctamente para interactuar con el receptor integrínico²²⁻²⁴. Por otra parte, en el momento de la activación del receptor, existe un acoplamiento físico que se establece entre el citoesqueleto de la célula y la parte citoplásmica del receptor integrínico²⁵. Se forma así un verdadero puente entre la ECM, el ligando, el receptor integrínico y el citoesqueleto. Por medio de estas conexiones, se ejercen fuerzas mediante la célula sobre la ECM y el desarrollo de estas fuerzas es indispensable para la activación óptima de estos receptores^{14, 26, 27}. Por tanto, es necesario que el ligando esté bien fijado para que estas fuerzas se puedan desarrollar pero también que la ECM presente una cierta resistencia manteniendo siempre una cierta plasticidad para que estas fuerzas se puedan desarrollar¹⁴. En el caso de células contráctiles como los cardiomiocitos, la diferenciación se obtiene únicamente con sustratos de rigidez intermedia²⁸. Las células endoteliales se diferencian formando capilares o estructuras de tipo tubular sobre sustratos flexibles mientras que, sobre sustratos más rígidos, tienen una tendencia a extenderse y a proliferar²⁹.

Con el fin de realizar estos tejidos contráctiles, se han desarrollado diferentes tipos de tejidos asociando células contráctiles a soportes sintéticos o biológicos (alginato, colágeno I, fibrina)^{4-8, 30}. Hasta ahora, no se ha descrito ninguna contractilidad *in vitro* en matrices sintéticas o matriz procedente de nanotecnologías utilizando la polimerización de oligopéptidos (véase Puramatrix®)^{31, 32}. Se obtuvieron los mejores resultados en términos de contractilidad *in vitro* con matrices de colágeno. Se trata lo más frecuentemente de matrices de colágeno obtenidas mediante reticulación física de fibras de colágeno mediante el procedimiento DHT (“dehydrothermal treatment”)^{33, 34}. No obstante, se trata de una técnica de reticulación del colágeno que sigue siendo considerada como moderada en comparación con otras técnicas de reticulación por vía química. La ventaja de las matrices de colágeno es su porosidad que facilita la inserción de células y la difusión de nutrientes y de oxígeno³⁵. No obstante, la supervivencia de las células en este tipo de soporte continúa siendo baja y la diferenciación continúa siendo parcial con ausencia apreciable de diferenciación terminal de cardiomiocitos⁵ y de células endoteliales³⁶⁻³⁹. Las contracciones espontáneas en este tipo de matriz continúan siendo escasas^{40, 41}. Y cuando están presentes, son anárquicas^{42, 43}. Las arritmias son frecuentes. Con el fin de mejorar estos parámetros, ciertos autores han propuesto utilizar un extracto proteico de membrana basal tipo Matrigel® asociado a un estímulo físico como una tensión mecánica o una electroestimulación crónica^{40, 41} y una concentración muy considerable de suero xenógeno en el medio de cultivo. El Matrigel® es un extracto de proteínas extracelulares de membrana basal de tumor renal (véase “Engel Brecht Swarm tumours”). El Matrigel® no puede ser empleado solo ya que su resistencia al colapso es insuficiente y debe estar asociado a un soporte más rígido sintético o biológico. Dentro de los conocimientos actuales, la utilización de tejidos contráctiles obtenidos recurriendo a Matrigel® no puede ser aplicada en el campo clínico humano debido al origen de este compuesto. Además, la presencia de Matrigel® está expuesta a numerosos efectos secundarios. Este gel limita la libre difusión de los nutrientes y se hace indispensable recurrir a sistemas de perfusión continua de tipo biorreactores⁴¹. Las dificultades de difusión limitan el grosor del tejido esperado y el rendimiento inapropiado para la sustitución de un músculo cardíaco.

Se han obtenido resultados alentadores *in vivo* en animales^{4, 5, 7} con soportes de colágeno celularizados mediante células contráctiles en presencia siempre de Matrigel®⁴⁵. Estas preparaciones *in vivo* pueden continuar latiendo durante varias semanas en diferentes sitios^{46, 47} e incluso mejorar la función cardíaca sistólica después de una aplicación en el músculo cardíaco⁴⁵. Se ha podido observar incluso en ciertos casos una sincronización espontánea entre estos soportes y el miocardio del animal receptor.

A pesar de estos resultados preliminares, la matriz de colágeno después de la implantación *in vivo* induce una reacción inflamatoria intensa que conduce rápidamente a una degradación de la matriz de colágeno⁴⁷. La degradación acelerada de la matriz debido a la reacción inflamatoria considerable es responsable de la liberación local de una gran cantidad de enzimas, radicales libres y diferentes productos de degradación que pueden comprometer también la supervivencia de las células asociadas a estos soportes. Los productos de degradación del

colágeno en sí mismos se ha informado que son tóxicos, particularmente para las células contráctiles⁴⁸. Además, las propiedades mecánicas de los soportes son alteradas por esta degradación incluso antes de que las células asociadas tengan tiempo de elaborar su propia matriz⁴⁹. La supervivencia de las células en los soportes 3D continúa siendo por tanto generalmente baja⁵⁰. Es incluso es más baja en soportes de colágeno y la diferenciación *in vivo* de las células contráctiles en los soportes de colágeno continúa siendo parcial. Existe, por otra parte, una baja angiogénesis en el implante que limita su funcionalidad. Para mejorar esta situación, ha sido indispensable la utilización de Matrigel®. Ha sido propuesta la utilización del Matrigel® asociado a matrices sintéticas para fabricar un miocardio artificial (véase Levenberg *et al.* patente de EE.UU. 20050031598). No obstante, Levenberg *et al.* mencionan que las propiedades físicas del Matrigel no son estables *in vivo* y que las células, después de ser inicialmente diferenciadas en este tipo de gel, se desdiferencian rápidamente. Además, el límite de la utilización de Matrigel® para estas aplicaciones es que se trata ante todo de un extracto tumoral en origen y, por tanto, no puede ser utilizado en el campo clínico humano. Por otra parte, el Matrigel® induce *in vivo* una reacción inflamatoria muy considerable que necesita la utilización de tratamientos inmunosupresores en el animal^{45, 47}. El Matrigel® induce además la formación de una fibrosis secundaria cicatricial poco vascularizada que compromete a largo plazo la supervivencia de las células.

La degradación de las matrices de colágeno es generalmente reducida mediante los procedimientos de reticulación de fibras de colágeno. La reticulación mediante DHT es un método clásico de reticulación física^{33, 51}. Así, los hemostáticos empleados en el campo clínico son obtenidos mediante DHT como la matriz Ultrafoam® (Bard). El colágeno inicial es soluble en una solución de 0,5% p/p de colágeno en ácido acético 0,05 M, pH 3,5. La preparación es liofilizada de forma controlada con el fin de obtener esponjas. El tamaño de los poros y su distribución depende principalmente de la rapidez de la congelación (0,25-1 °C/min.), de la temperatura de congelación final (-90 °C a -5 °C)⁵². Esta esponja se somete seguidamente a una reticulación mediante DHT (105 °C durante 16 h para una presión inferior a 100 mTorr) para introducir enlaces covalentes entre las cadenas del colágeno sin desnaturalizarlo en gelatina^{53, 54}. Aunque estas matrices sean compatibles *in vivo* con el desarrollo de un tejido de miocardio (gracias a su constitución, su resistencia, sus propiedades mecánicas, el tamaño de sus poros compatibles con la difusión de los nutrientes)^{40, 55}, esta matriz de colágeno obtenida mediante DHT provoca una reacción inflamatoria intensa después de su implantación en los músculos (por ejemplo, músculos esqueléticos espinales) conduciendo a su degradación en el transcurso de algunas semanas.

Por tanto, es necesario prever la utilización o asociación de otros métodos de reticulación del colágeno. Con el fin de limitar esta degradación, el colágeno puede ser asociado a polímeros sintéticos⁵⁶ o compuestos orgánicos o no orgánicos como, por ejemplo, la seda.

Muy recientemente, se ha propuesto una reticulación enzimática mediante transglutaminasa⁵⁷. La reticulación del colágeno se puede obtener mediante las células y sus productos naturales. Esta reticulación endógena puede ser aumentada por medio de ácido ascórbico o de ribosas. Estas reticulaciones pueden ser obtenidas mediante células musculares que producen una enzima de tipo lisiloxidasa que realiza una reticulación entre los grupos aminos libres de los residuos de lisina y los residuos de hidroxilisina del colágeno. Otra propuesta consiste en reticular fibras de colágeno recurriendo a tratamientos químicos como, por ejemplo, una reticulación mediante glutaraldehído⁵⁸, difenilfosforilazida (DPPA), carbodiimida⁵⁹, etc.

El método más eficaz para reticular el colágeno continúa siendo una reticulación química mediante glutaraldehído^{51, 58}. No obstante, el glutaraldehído se puede autopolimerizar y seguidamente despolimerizar lentamente en la preparación biológica, liberando glutaraldehído libre que es tóxico para la célula y, por tanto, no compatible con la terapia celular.

Por tanto, aunque se ha propuesto la fabricación de tejido cardíaco con soportes sintéticos (patentes de EE.UU. 20050031598, 20040242469), no existen actualmente soportes tridimensionales sintéticos o biológicos utilizables para el hombre y en los que se demuestre una contractilidad en presencia de células contráctiles⁶⁰. De aquí el objeto de esta invención.

Por una parte, aparte de los soportes basados en colágeno, se están desarrollando otros soportes biológicos basados en fibrina o fibrinógeno y han sido propuestos soportes de fibrina para la inyección de células en el miocardio⁶¹⁻⁶⁴. El fibrinógeno es soluble y bajo el efecto de la trombina y de calcio, el fibrinógeno se transforma en fibrina que precipita. Las propiedades de este gel pueden ser controladas mediante la concentración de trombina y de fibrinógeno⁶⁵. Las propiedades físicas de las fibras de fibrina en cuanto a la extensibilidad y adaptación a las restricciones son excelentes⁶⁶. La fibrina es un material que es utilizado para la terapia celular y la ingeniería de tejidos. La fibrina ha sido propuesta para suministrar células en soportes sintéticos o para fabricar tejidos cardíacos⁶⁷, para inyectar células en el miocardio⁶⁸ (patente de EE.UU. 200502761631), para fabricar válvulas cardíacas⁶⁹, de endoprótesis cardíacas⁷⁰, para la cicatrización de tejido bronquial o para fabricar conductos vasculares⁷¹.

Se ha mostrado *in vitro* que durante la gelificación, se podrían añadir al soporte diferentes factores de crecimiento o péptidos de adhesión como el péptido RGD⁷². Entre estos factores, la presencia de péptido RGD mejora la angiogénesis en el soporte, aunque la fibrina ya contiene el resto RGD⁷³. Pero que hay que destacar que en estos

experimentos, el RGD no se fija de manera covalente al soporte y que, por otra parte, los geles de fibrina tienen tendencia a hacerse compactos con el tiempo con pérdida de las propiedades mecánicas y el soporte ya no permite la angiogénesis⁷⁴. La utilización de este tipo de gel con células madre plantea igualmente ciertos problemas ya que si la concentración de fibrinógeno es demasiado baja, el gel se licúa y desaparece en algunas semanas. Si la concentración de colágeno es demasiado elevada, las células madre ya no se diferencian en este tipo de soporte⁷⁵. Debe apreciarse que ha sido propuesta también la asociación de fibrinógeno con otros componentes⁷⁶ y que se han desarrollado también hidrogeles de colágeno y fibrina. Por las razones anteriormente expuestas es por lo que se ha propuesto en esta invención modificar el componente de colágeno o el fibrinógeno o la fibrina asociados al soporte con moléculas de adhesión fijadas de forma covalente.

Entre las moléculas de adhesión el resto RGD (Arg-Gly-Asp) es un ligando reconocido por un cierto número de receptores integrínicos presentes particularmente en las células contráctiles o sus progenitores y en células endoteliales. Existen además otros numerosos ligandos péptidos de adhesión. Este ligando está presente normalmente en el colágeno pero en una forma no accesible a las células si el colágeno no es desnaturalizado ("expresión críptica"). La modificación del soporte de colágeno con moléculas RGD ha sido propuesta en aplicaciones²² como la regeneración ósea y para la realización de tejidos dérmicos⁵¹. En el campo torácico y cardiovascular, la asociación covalente a colágeno de restos de adhesión como péptidos RGD nunca fue propuesta para la ingeniería de tejidos y la terapia celular. Cuando se menciona el resto RGD, los estudios descritos describen el efecto perjudicial del RGD en términos de contractilidad, función miocárdial, características de ritmo y sobre las fuerzas desarrolladas. La ausencia de fijación del resto RGD podría explicar el efecto perjudicial del RGD sobre la contracción muscular por el grupo de Sarin *et al.*⁷⁸ y la internalización del resto⁷⁹ así como los resultados descritos por SY. Boateng *et al.*⁸⁰. Como se propone en esta invención, estos resultados negativos son debidos probablemente teniendo en cuenta una mala utilización del péptido y debidos a la ausencia de un enlace covalente del péptido utilizado en el soporte en estos diferentes estudios. Esto explica la internalización del resto en el estudio de S. Balasubramanian *et al.*⁷⁹. Ha sido propuesta la utilización del resto RGD para la terapia celular del corazón (patente de EE.UU. 20050271631) pero se trata de la asociación de RGD a geles de fibrina y no a colágeno, el RGD no es fijado de forma covalente y no se mencionan las otras moléculas de adhesiones. En los dispositivos médicos y quirúrgicos en el campo torácico y cardiovascular, se ha propuesto asociar el resto RGD al componente metálico de la endoprótesis coronaria con el fin de favorecer la adherencia de células endoteliales en circulación y hacer que la endoprótesis sea menos trombógena. El RGD cíclico ha sido asociado recientemente al componente matricial (polímero sintético) de una endoprótesis metálica (de plata) para disminuir la restenosis precoz favoreciendo la adhesión de los progenitores en circulación para las células endoteliales⁸¹. La fijación de péptidos de adhesiones sobre soportes que ya no son de colágeno sino sintéticos ha sido prevista la ingeniería de tejidos cardíacos. Es un hecho que hasta hoy no se ha demostrado ninguna contractilidad *in vitro* o *in vivo* en este tipo de soportes sintéticos⁶⁰.

Hasta el momento, no ha sido demostrada ninguna actividad contráctil *in vitro* e *in vivo* en soportes de tipo sintético. Solo los soportes de colágeno han permitido el desarrollo de la contractilidad. Solo se ha obtenido una diferenciación terminal de cardiomiocitos *in vitro* en presencia de un extracto tumoral de tipo Matrigel. A esto se debe el interés de soportes de colágeno modificados que son objeto de la presente invención.

Se han propuesto diferentes métodos para injertar péptidos de adhesión en colágeno. Generalmente, un grupo reactivo de péptido reacciona con un grupo amino presente en el colágeno en la extremidad terminal de las cadenas polipéptidas o bien mediante las cadenas laterales de lisina. Por ejemplo, la parte C terminal es transformada en acil-azida. La fijación del péptido al colágeno se hace seguidamente mediante un enlace amido. Este método supone la formación de un gran número de productos secundarios, no es selectivo y no permite utilizar separadores que mantengan una distancia conveniente de la proteína de colágeno, a la secuencia péptida injertada susceptible de asociar el receptor integrínico. Otra propuesta consiste en modificar el péptido con un grupo isocianato y hacer reaccionar este grupo con una amina primaria para obtener un enlace de tipo tioamida. Este último método ha sido propuesto por el grupo de Myles *et al.*⁸² que ha propuesto fijar un péptido de adhesión como RGD a colágeno antes de la fibrinogénesis, utilizando un agente de acoplamiento heterobifuncional de Pierce® soluble en agua (Sulfo-LC-SPDP) que permite asociar un péptido que contiene un grupo tiol a un grupo amino primario del colágeno. La dimensión lineal del agente de acoplamiento es de aproximadamente 16 angströms.

La técnica descrita por JL Myles *et al.*⁸² está limitada a la utilización de secuencias péptidas de adhesión asociadas a un residuo que contiene un tiol, lo que obliga generalmente a modificar el péptido acoplándolo a una molécula de cisteína. La modificación del péptido puede suponer una interacción diferente del péptido con su receptor. Otros han propuesto efectuar el acoplamiento del péptido con un colágeno en fase líquida antes de la fibrinogénesis. Con el fin de prevenir la fibrinogénesis espontánea, las reacciones se deben efectuar a pH ácido. Por tanto, el acoplamiento del péptido al colágeno está favorecido por un medio básico o neutro. Por otra parte, la purificación de los productos de la reacción realizada en fase homogénea es difícil y la separación de productos secundarios necesita recurrir a varias etapas de purificación por cromatografía. Esta dificultad puede ser evitada si la reacción se realiza en fase heterogénea, por ejemplo, en colágeno insolubilizado mediante tratamientos preliminares de reticulación. Finalmente, la técnica de Myles *et al.*⁸² no permite controlar la realización de reacciones de acoplamiento y deja disponibles grupos aminados capaces de provocar reacciones de duplicación de secuencias péptidas. Es necesario añadir a esto que la separación de los péptidos de adhesión obtenida mediante este método no sobrepasa los 16

angströms, lo que es claramente insuficiente para presentar péptidos de adhesiones de forma óptima (30-40 angströms)^{23, 24}. Se propone en la siguiente invención una solución a este problema.

La presente invención tiene por objeto la producción de un medio biológico natural tridimensional optimizada para la terapia celular o la ingeniería de tejidos o la mejora de dispositivos para aplicaciones médicas o quirúrgicas en los campos torácico y/o cardiovascular. Esta invención se refiere a la fabricación de un soporte o estructura principal (scaffold) tridimensional, sólida, pudiendo ser utilizados estos términos de forma indiferente. Este soporte está constituido por una esponja de colágeno en la que el colágeno es reticulado y además es modificado en parte o integralmente mediante la fijación covalente de moléculas de adhesión asociadas o no a agentes bioactivos que no están necesariamente disponibles o accesibles sobre el soporte o la estructura principal de origen, estando exento el colágeno de cualquier extracto tumoral. Estos soportes tridimensionales modificados pueden ser inseminados y/o colonizados por células capaces de desarrollar sus capacidades potenciales fisiológicas.

La estructura principal tridimensional contiene componentes reticulados o no reticulados. La estructura principal tridimensional puede ser formada antes o secundariamente después la implantación que sigue a la polimerización de algunos de sus componentes. La estructura principal tridimensional en ciertos casos puede ser inyectada. Esta inyección se puede hacer, por ejemplo, en un vaso sanguíneo, en una cavidad bronquial, en un tejido, en un espacio o una cavidad, en otro soporte, en un dispositivo médico utilizado en terapia cardiovascular y torácica o una combinación de los mismos. La inyección se puede hacer *in vitro* y/o *in vivo*. La estructura principal tridimensional puede proceder de la polimerización de algunos componentes que se producen espontáneamente después de la implantación o después de una fotoactivación, irradiación como la ultravioleta, irradiación gamma, corriente eléctrica, interacción magnética, interacción iónica, química, de temperatura, ultrasonidos, sal, enrollamientos hidrófobos/hidrófilos, fuerzas de van der Waals, enlace aromático π de metal-ligando, pH, concentración, redox, fosforilación, apilamiento, fuerzas mecánicas, electromagnéticas o gravitatorias. Esta polimerización o reticulación puede proceder de una reacción química con agentes reticulantes conocidos y derivados y/o sus análogos, derivados y combinaciones, genipina, aglicón de ácido nordihidroguayarático, ácido dimelítico, ruterina, ácido nordihidroguayarático, transformación enzimática, trombina, tratamiento deshidrotérmico, reticulación endógena mediante células y sus productos bioquímicos normales (como la lisina oxidasa producida por una célula) o asociación de algunos de estos procedimientos.

La estructura principal tridimensional es en su totalidad o parcialmente no biodegradable.

La estructura principal tridimensional se forma en una fase líquida que, una vez suministrada, después o sin activación, se puede transformar en fase sólida (por ejemplo, solución, pasta, gel, coloide en suspensión, plasma).

La estructura principal tridimensional puede ser de un hidrogel constituido por aminoácidos hidrófobos e hidrófilos capaces de ensamblarse espontáneamente en estructuras macroscópicas.

La estructura principal tridimensional puede ser un gel o un agente tensioactivo. La estructura principal tridimensional o la estructura principal es un agente tensioactivo o un "agente inteligente", es decir, una materia biológica constituida por estructuras espontáneamente ensambladas a gran escala que se basa en interacciones locales a nivel molecular.

En la estructura principal tridimensional, la construcción 3D puede ser obtenida mediante superposición de cultivos obtenidos sobre estructuras 2D diferentes. La adherencia de las células a este soporte 2D puede ser modulable. Estos soportes 2D pueden contener colágeno/fibrina/fibrinógeno modificados mediante fijación de moléculas de adhesión.

Pueden estar superpuestas también varias estructuras principales 3D de naturaleza diferente de forma secuencial o no secuencial. La estructura principal tridimensional puede formar una matriz de células en la que la construcción de tejido artificial contienen biomateriales de formas escogidas que faciliten el reagrupamiento estructural: micro- o nanoestructuras (por ejemplo, tubos micro o nano, nanopartículas, micro- o nanoporos. Las micropartículas o las nanopartículas están hechas de silicio, poli(ácido láctico), mezcla de ácido copolímero de ácido glicólico-láctico, ciclodextrina, liposoma conjugado o no a las nanopartículas quantum dot, magnetita, filamentos, análogos estructurales para formar la interfase exterior, análogos péptidos de estructuras β o α que forman filamentos o tubos, esponja, polvo, conducto, esfera, microesfera, película, micro- o nanofibrillas, membrana de lípido, fibra, malla, matriz, parche, hoja de tejido, paño suave o una combinación de los mismos.

Los diferentes tipos de soporte pueden estar asociados.

La estructura principal tridimensional contiene colágeno que está constituido por colágeno ((I, II, III, IV, V, VI, VII, XI y otros colágenos) o por la asociación de diferentes especies. El término "colágeno" indica igualmente colágeno insoluble, colágeno soluble, atelocolágeno preparado suprimiendo telopéptidos en las extremidades de la molécula de colágeno y utilizando una proteasa distinta de la collagenasa. La estructura principal tridimensional de colágeno puede ser también un tejido normal de origen autólogo, homólogo o heterólogo. Este tejido ser descelularizado o no físicamente y/o enzimáticamente (por ejemplo, con collagenasa) y/o químicamente modificado o asociado. El

colágeno puede ser purificado a partir de tejido que contiene colágeno: autólogo, homólogo o heterólogo (como uréter, pericardio, bajo la mucosa como bajo la mucosa intestinal de cerdo "SIS"^{83, 84}, vaso sanguíneo, tendón, fascia, dermis descelularizada o no, aponeurosis, membrana de tipo membrana amniótica, duramadre, válvula cardíaca, etc.). Podría ser de copias sintéticas de colágeno como fibras de polímeros o péptidos que forman fibrillas.

5 El colágeno puede ser química modificado y el producto obtenido mediante succinilación o esterificación o formación de carboxiamidas, o desaminación de los colágenos anteriormente descritos, mezcla de colágeno con polímeros sintéticos como poli(ácido láctico) (PGA) y/o poli (DL-láctido-co-glicolido) (PLGA) y/o poli(DL-láctido-co-caprolactona) (PCL), un derivado de colágeno como la gelatina, un polipéptido obtenido mediante hidrólisis de colágeno, colágeno desnaturalizado por calentamiento. Los polímeros sintéticos asociados al colágeno se pueden escoger entre
10 poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(L-láctico) (PLLA), PLGA, polianhídridos (PA), policarbonato (PC), hidroxácidos, poliorto-ésteres (POE), polifumaratos (PPF), polisacáridos, polilactona (PL), policaprolactonas, poliamidas, ácidos de poliamino, poliacetales de polifosfazenos (PPZ), policianoacrilatos biodegradables, poliuretanos biodegradables (unidad central), polisacáridos, polipirrol, polianilinas, politiofeno, poliestireno, poliéster (PE), poliuretanos no biodegradables, poliureas, poli(tereftalato de etileno) (PET), poli(acetato de vinilo de etileno),
15 polipropileno, polimetacrilato, polietileno, policarbonatos, poli(óxido de etileno), poli(alcohol vinílico) (PVA), fuseau-tex (politetrafluoroetileno), dacron (poli(tereftalato de etileno)), politetrafluoroetileno (PTFE), poli-etilenglicol (PEG), copolímeros descritos con anterioridad, con uno de los aditivos siguientes y mezclas de uno de los polímeros, o de los copolímeros, y de los aditivos entre ellos en asociación de derivados sintéticos con los productos biológicos.

20 El colágeno puede ser solamente un componente de la estructura principal 3D que puede contener sustancias sintéticas, inorgánicas (como vidrio, Si/SiO₂, titanio/óxido de titanio o cromo, cobalto, diamante, platino e hidroxapatita, nitinol, acero, sílice, estreptavidina-biotina, una proteína artificial como látex, nylon, catgut, algodón, tela, poliéster, seda, plástico, cerámica, aleaciones, materias textiles, avidina, estreptavidina, esponja de copolímero-caprolactona-Co-L-láctido reforzado con poli(L-láctido), hecho de tejido tricotado de ácido hialurónico (PCLA),
25 almidón y cualquier mezcla), materiales orgánicos biológicos (como proteoglicanos, glicoproteínas, glicoaminoglicanos, alginato, agarosa, ácido hialurónico, agar, quitosano, par de fibrinógeno/fibrina, quitosano, carboximetilado y una mezcla de estos, gelatina, octasulfato de sacarosa, dextrano, celulosa, celulosa metilada, sefarosa, proteína imitada mediante Sephadex (como látex) o su asociación. La estructura principal tridimensional de colágeno puede ser "colágeno" contenido en un dispositivo médico usado en medicina o cirugía cardiovascular y
30 torácica como, por ejemplo: válvulas cardíacas (por ejemplo, válvulas fabricadas a partir de células autólogas comprendido el cordaje, músculo capilar, etc.), un dispositivo médico usado en medicina o cirugía cardiovascular y torácica como, por ejemplo: válvulas cardíacas (por ejemplo, válvulas fabricadas a partir de células autólogas comprendido el cordaje, músculo capilar, etc.) bioprótesis cardíacas, anillos de válvulas cardíacas, tubos de válvulas, contenidos colágenos de endoprótesis coronarias (de tipo "endoprótesis eluidas con fármacos",
35 endoprótesis celularizadas, "endoprótesis biodegradables"), membranas de hemocompatibilidad, adhesivos, dispositivos de contención de miocardio biodegradables (parcialmente, totalmente o no) que pueden estar celularizados o no y/o asociados (físicamente o no) a otro soporte que puede en sí estar celularizado, parche, asistencia biológica cardíaca destinada a favorecer, por ejemplo: la contractilidad o la regeneración. Un sustitutivo de miocardio, un sistema de contención para tratar estados del miocardio o un miocardio patológico. Un conducto
40 vascular espontáneamente contráctil o bajo estimulación eléctrica, por ejemplo, marcapasos biológico, soporte para la inyección celular, matriz o soporte de sustitución, soporte asociado a la terapia celular, prótesis vascular, conducto vascular (incluido el injerto coronario), endoprótesis, materiales de regeneración o para la reparación o sustitución de tejidos, favorecimiento de la cicatrización, prevención de la dehiscencia, favorecimiento de la estanqueidad, prótesis/tejido de sustitución traqueal o bronquial, endoprótesis bronquial, conducto traqueal o bronquial,
45 endoprótesis bronquial, "espiral bronquial", "bypass bronquial", tejido pulmonar, dispositivo para el suministro de un agente, soporte 3D de colágeno asociado a un dispositivo médico o quirúrgico, etc.

La estructura principal puede comprender también fibrina, de peso molecular elevado y bajo. Las diferentes modificaciones del colágeno pueden ser aplicadas a la fibrina. La fibrina y el fibrinógeno pueden ser empleados uno
50 en lugar del otro. Las diferentes formas de "colágeno", "fibrinógenos"/"fibrina" pueden estar asociadas.

La presente invención tiene por objeto la producción de un medio biológico natural tridimensional, optimizado para el trasplante celular en el miocardio, por ejemplo, gracias a la modificación de su colágeno y mediante péptidos de adhesión. El colágeno es una molécula natural que posee ya ciertos ligandos para las células. No obstante las
55 células, en función de su tipo celular, específico con su medio y para un medio dado, permiten o no el desarrollo de este tipo de celular.

Las moléculas de adhesión pueden unir químicamente el fibrinógeno o la fibrina y/o estar contenidas en el constituyente de colágeno asociado de la preparación, en el caso del gel de colágeno y de la fibrina, por ejemplo.

60 Las moléculas de adhesión incluyen polinucleótidos, péptidos de adhesión que incluyen péptidos, polipéptidos, proteínas o moléculas capaces de unirse a los receptores celulares favoreciendo la adherencia celular con las elevadas afinidades como es el caso de los receptores integrínicos y según los datos bibliográficos actuales. Los péptidos de adhesión pueden estar formados por aminoácidos naturales o no y/o análogos. Uno o varios
65 aminoácidos del péptido de adhesión pueden estar sustituidos. Los péptidos de adhesión incluyen péptidos, polipéptidos o proteínas o moléculas (de orígenes naturales o no) que contienen la secuencia de adhesión inicial.

Los términos polipéptido, péptido y proteína pueden ser empleados de forma intercambiable. Esto comprende también la adición de una entidad química como un grupo hidrato de carbono, un grupo fosfato, un grupo farnesilo, un grupo isofarnesilo, un grupo ácido graso, un favorecedor de enlace para la conjugación, funcionalización o cualquier otra modificación o asociación orgánica o inorgánica de la molécula incluido polietilenglicol (PEG) o cualquier otra molécula sintética. Estas modificaciones pueden incluir también la ciclación del péptido que contiene la secuencia de adhesión. Pueden estar asociados varios péptidos de adhesión y el péptido se puede referir a un péptido individual o una colección de péptidos.

Las moléculas o los péptidos de adhesión pueden ser modificados y pertenecer también a una misma molécula o a una molécula que sirve intermedio para el enlace al soporte.

Además están incluidos en el péptido los péptidos de adhesión que están destinados a interaccionar con el receptor de adhesión en sí mismo, con los co-receptores (no necesariamente implicados en la adhesión). El enlace a estos co-receptores modifica la adhesión y/o la activación y/o la transducción del receptor.

Según la presente invención el péptido de adherencia podría ser ventajosamente el péptido RGD correspondiente a arginina (R)-glicina (G)-ácido aspártico (D), resto de reconocimiento de la integrina sobre la fibronectina descrito por Pierschbacher et al. ("RGD linéaire" (Pierschbacher MD. *et al.* 1984)⁸⁵) o sobre la vitronectina como se describe por Plaff M. *et al.* ("RGD cíclico" (Plaff M. *et al.* 1994)⁸⁶). El "resto RGD" incluye también todos los ligandos péptidos que interaccionan con uno de los receptores integrínicos $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_v\beta_8$, $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_4\beta_7$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_8\beta_1$. Otros péptidos de adhesión son los péptidos PHSRN o dominio obligatorio proteoglicano de la matriz extracelular (dominios obligatorios de heparina) basados en X-B-B-X-B-X o X-B-B-B-X-X-B-X, moderados por la ordenación B-B-X-B, en la que B es un aminoácido de base y X es un hidroxaminoácido, YIGSR (Iwamoto y otros, 1987)⁸⁷ y IKVAV (-Lys-Val-Ala-Val-) (Tashiro *et al.* 1989)⁸⁸, RYWLPR o RNIAEIIKDI (Liesi P. *et al.* 1989)⁸⁹ de la laminina, REDV (Massia SP *et al.* 1992)⁹⁰, PHSRN (-Pro-His-Ser-Arg-Asn) (Aota S. *et al.* 1994) o KNEED (Altroff H. *et al.* 2001, Wong JY *et al.* 2002)^{91, 92} o EILDV de la fibronectina, dominio obligatorio de proteoglicano de las proteínas de adhesión como KRSR (Dee KC *et al.* 1998; Rezanian A. *et al.* 1999)^{93, 94} o FHRIKA (Rezanian A. *et al.* 1999)⁹⁵, secuencia de VAPG y KQAGDV de la elastina (Mann et West *et al.* 2002)⁹⁶, GFOGER del tipo I de colágeno (Emsy J. *et al.* 2000)⁹⁷, DEGA.

En un caso particular de la invención, el ligando contiene el resto RGD presente en las proteínas de la ECM como la fibronectina o vitronectina pero los demás ligandos muy numerosos pueden estar asociados de la misma manera (por ejemplo, secuencias péptidas derivadas de laminina, etc.) incluidos los ya presentes en el colágeno.

La presente invención suministra igualmente un método simple, partiendo de una estructura principal constituida totalmente o en parte por colágeno y que contiene grupos funcionales disponibles como tiol o amino o carboxílicos, para unir moléculas de adhesión o moléculas de interés o bien para liberarlas *in situ* de forma controlada. Este método tiende a mejorar la presentación de estas moléculas o de los agentes biológicos (como los proteoglicanos, los factores de crecimiento o las citoquinas) con respecto a los receptores de membrana de células capaces de habitar la matriz colágena modificada.

En una aplicación particular de la invención, el agente de acoplamiento heterobifuncional es sulfo-LC-SPDP.

La invención se caracteriza por una presentación espacial mejorada del péptido o del factor de crecimiento, una disminución de la reacción secundaria o del acoplamiento inter- y/o intramolecular no deseable, que mejora la eficacia global del acoplamiento mientras que es posible el control de cada etapa del procedimiento.

La técnica empleada utiliza un mismo reactivo heterobifuncional fijado, por una parte, sobre el péptido de adhesión y, por otra parte, sobre el péptido colagénico. La funcionalización del soporte colagénico permite, además, presentar el péptido de adhesión a su sustrato a una distancia de 36 angströms, distancia que es conocida por ser la distancia óptima para la presentación de los péptidos de adhesión (entre 30-40 angströms)^{23, 24}. La reacción permite acoplar de forma unidireccional el péptido sobre el sitio activo del soporte sin duplicación del péptido. Todas las etapas intermedias de la reacción pueden ser controladas mediante un simple análisis espectrofotométrico del medio. Si el acoplamiento de la molécula se efectúa sobre un soporte sólido, no es necesaria ninguna cromatografía para eliminar los productos intermedios que pueden ser eliminados mediante un simple lavado. Además, la reacción se puede realizar a pH neutro o alcalino, que son las condiciones más favorables para la conjugación. La molécula puede contener grupos enmascaradores que permitan las reacciones sucesivas al sustrato y a los ligandos. Los métodos de enlace se refieren a moléculas que reaccionan con cadenas laterales de los aminoácidos (por ejemplo, amino o tiol o alcohol o aldehído o amido o grupos ácidos o las combinaciones de estos) en los sustratos (por ejemplo, la cadena principal 3D y los péptidos RGD escogidos). El método se aplica si el enlace tiene lugar antes o después de la fibrinogénesis del colágeno. Este método se aplica también a cualquier otro método para acoplar los grupos aminados del colágeno utilizando un agente de acoplamiento heterobifuncional que contiene también un grupo tiol enmascarado que permite activar separadamente el péptido y el colágeno. Estos enlaces químicos pueden ser formados también de forma irreversible por otros medios como radiaciones ionizantes, iniciación por radicales libres u otros reagrupamientos moleculares. Puede ser utilizado un residuo maleimido en lugar de un grupo piridildisulfuro. La invención propone también un método para unir el resto RGD como derivado sulfurado a una

estructura principal metalizada en la medida en que el metal esté revestido por una capa fina metálica que presente una fuerte afinidad por los átomos de azufre del péptido RGD funcionalizado para el acoplamiento. Por otra parte, el enlace covalente de la molécula de adhesión sobre el soporte o sobre un agente fijado sobre este soporte puede ser posteriormente escindido mediante reacciones químicas, enzimáticas, térmicas, mecánicas o una asociación de las mismas.

La presente invención describe procedimientos para aumentar la biocompatibilidad de las estructuras principales de colágeno utilizando reactivos químicos no tóxicos que permiten la reticulación del soporte, la fijación de las moléculas de interés y el crecimiento *in situ* de las células favorecido por la presencia de moléculas de adhesiones como péptidos de adhesión o factores anteriormente mencionados.

Hasta ahora, la reticulación por vía química más eficaz para el colágeno ha sido obtenida con el glutaraldehído. El glutaraldehído se puede polimerizar y seguidamente hidrolizar, liberando glutaraldehído libre que es citotóxico. Esta estructura principal, por tanto, no puede ser empleada para la ingeniería de tejidos.

Un modo de fijación consiste por tanto en obtener una fijación irreversible del glutaraldehído mediante la neutralización de los grupos aldehído residuales por una reticulación irreversible de un glicosaminoglicano como heparina o sulfato de heparina. En la primera propuesta, el tejido es fijado mediante glutaraldehído y los grupos aldehído libres son neutralizados de forma irreversible utilizando un glicosaminaglicano (GAG) como heparina/sulfato de heparina, sulfato de condroitina o sulfato de dermatano. Los GAG son conocidos para regular el grado de hidratación de las matrices, pero sirven también de ligando para muchos factores de crecimiento. Lee *et al.* han descrito un método para limitar los grupos aldehído reactivos después de una fijación con glutaraldehído bloqueando con amino-polietileno-oxisulfonato (véase NH.sub.2-PEO-SO.sub.3 (véase Lee *et al.* (2001))⁹⁸ o con heparina. Dove JS (patente de EE.UU. 20060217805) han propuesto fijar el tejido del glutaraldehído y seguidamente tratar el tejido con un agente reductor capaz de reducir el glutaraldehído, probablemente las iminas y los grupos carboxílicos en los tejidos fijados. No obstante, el método empleado para fijar un tejido es difícilmente trasladable a un soporte colagénico considerablemente más frágil. Parece más apropiado utilizar agentes reductores menos drásticos para producir los grupos iminos formados durante la reacción de los grupos amino con el glutaraldehído.

Con el objetivo de mejorar la compatibilidad, otra propuesta consistiría en utilizar agentes reticulantes diferentes del glutaraldehído. Se sabe, por Y. Chang *et al.* (2002); HC Liang (2004); CC Tsai *et al.* (2001)^{99, 100} (patente de EE.UU. 20050013802), que la genipina ha sido propuesta para reticular tejidos nativos o descelularizados. La utilización de genipina por el contrario no ha sido propuesta como agente para fijar soportes colagénicos reconstituidos a partir de fibras de colágeno y destinados a ser celularizados. Las únicas publicaciones que se refieren a la utilización de genipina en el campo cardiovascular se refieren al control de la degeneración del componente colagénico de dispositivos médicos como "drug eluted stent" (patente de EE.UU. 20050123582). No se trata en este caso de una endoprótesis celularizada, teniendo como objetivo el componente "drug" controlar la proliferación celular mediante su toxicidad. En la presente invención se propone emplear la genipina en asociación o no con otros tratamientos físicos como UV, irradiación mediante haces ionizantes, deshidratación y tratamiento mediante calor (dehydrothermal crosslinking (DHT) KS Weadock *et al.* (1996)³³ para estabilizar la matriz artificial de colágeno (colágeno, gelatina o quitosano) para la ingeniería de tejidos después o antes de una asociación con péptidos de adhesión como RGD.

La presente invención se distingue de la patente de Mooney *et al.* de EE.UU. 6.642.363 (2003) en la medida en que se refiere a la fabricación de un tejido artificial para aplicaciones cardiovasculares que comprenden esencialmente miocitos sembrados en una matriz de colágeno biodegradable, mientras que los autores citados describen la fabricación de un tejido a partir de cadenas de polialginatos.

La presente invención se distingue de la patente de Barerra *et al.*, patente de EE.UU. 5.399.665 (1995) en que utiliza polímeros funcionalizados pero no colágeno.

La presente invención se distingue de la patente de Hai-Quan, Mao *et al.*, patente de EE.UU. 20050058692 en que utiliza colágeno como biomolécula ligando de una matriz de polímero sintético.

En la presente invención se suministra por primera vez la evidencia de que la diferenciación terminal de la célula contráctil puede ser obtenida en matrices colagénicas mediante simple fijación sobre matrices de péptidos de adhesión como el péptido RGD. La actividad contráctil espontánea o bien obtenida mediante estimulación es aumentada, así como el umbral eléctrico, siendo estos factores muy importantes ya que, después de su implantación, es necesario que el miocardio implantado sea estimulado por el músculo cardíaco nativo con el fin de que las contracciones se produzcan de forma coherente. Se propone también una manera de retrasar la respuesta inflamatoria y la respuesta inmunológica contra el injerto mediante las propuestas de reticulación química no tóxica. El péptido RGD fijado a la matriz colagénica favorece también la angiogénesis *in vitro* e *in vivo*. En efecto, se sabe por Levenberg S. *et al.* (2005)¹⁰¹ que la prevascularización o la angiogénesis locales son elementos importantes para favorecer la funcionalidad del implante y la supervivencia de las células asociadas.

El agente puede ser un agente químico, físico, biológico o una combinación de los mismos. Puede ser, por ejemplo, un factor de crecimiento, una fuerza mecánica (comprendidas, pero no exclusivamente, las interacciones exteriores,

la fuerza de cizallamiento y la fuerza mecánica), estímulos eléctricos, una tensión eléctrica, un campo magnético, una biomolécula y una molécula pequeña o una combinación de los mismos.

Son de interés particular los agentes que controlan la adhesión de las células, la supervivencia, la proliferación, la apoptosis o la diferenciación. Se puede tratar de agentes que controlan la angiogénesis, la isquemia, la degradación, la renovación, la inmunogenicidad de la matriz extracelular, la reacción inflamatoria o inmunológica, la instalación de células en su entorno (alojamiento celular), la proliferación tumoral, la función del miocardio, vascular o traqueobronquial o pulmonar. Para los agentes biológicos, el agente o su(s) receptor(es) puede(n) ser empleado(s) de forma indiferente.

La denominación "agente" comprende también: colágeno, fibrina o fibrinógeno, citoquina, quimocina, ecosanoides, glicoproteínas, glicosaminoglicano (por ejemplo, heparina/sulfato de heparina (por ejemplo, incluido con anterioridad sindecano 1; 2; 3; 4), condroitina (incluidos, pero no exclusivamente, condroitina 4 y 6)/sulfato de dermatano o sulfato de queratano, agentes de queratano y quimiotácticos, un receptor de factor de crecimiento, una enzima, una hormona o su receptor, un factor angiogénico, un factor promotor de la vascularización o factor que la impida, un antígeno vacunador, un anticuerpo, un factor de coagulación, una proteína de normalización, un factor de transcripción, un factor de diferenciación, un receptor, ADN, cDNA, aptámeros de ADN, una toxina, una proteína estructural, una molécula de adhesión, fármaco, medicamento, quimioterapia, antibióticos, agentes antifúngicos y antibacterianos, agentes antimicrobianos antivirales, antiinfecciosos y cualquier fragmento, variante o combinación de los mismos.

En un modo de realización específico el depósito de este agente suministra localizaciones para depositar un material biológicamente activo para el tratamiento de la isquemia o la disfunción cardíaca, como un agente bloqueante alfa o beta adrenérgico, o agonistas, activadores de AMP-quinasa, inhibidores de enzima de conversión de angiotensina (ACE), receptores de angiotensina II, agentes antiarrítmicos, agentes anticoagulantes, agentes antiagregación plaquetaria, agentes antidiabéticos, antioxidantes, agentes antiinflamatorios, secuestrantes de ácido biliar, bloqueantes de canales de calcio, antagonistas de calcio, inhibidores de CETP, reguladores de colesterol y lípidos, fármacos que bloquean la conversión de ácido araquidónico, diuréticos, agentes de sustitución de estrógenos, agentes inotrópicos, análogos de ácidos grasos, inhibidores de la síntesis de ácidos grasos, fibrato, histidina, derivados de ácido nicotínico, nitratos, activadores de la proliferación de peroxisomas agonistas o antagonistas de los receptores, ranolizina, estatinas, talidomida, tiazolidinodionas, agentes trombolíticos, vasodilatadores y vasopresores y otras listas de factores SDF-1, factor mesenquimal hospedante de células como alfa MCP-3, OEB, ligando de TGF alfa o beta de la superfamilia, quimosinas de LIF, BMP, receptores de BMP, etc., la molécula señalizadora como la smad o la Ikb3, BMP2, BMP4, etc., incluidos también pero no exclusivamente, el fármaco, el factor de crecimiento y escogido entre activina-A (ACTE), ácido retinoico (RA), factor epidérmico de crecimiento, proteína morfogenética o sea, factor de crecimiento tumoral TGF como "TGF- β ", HGF (factor de crecimiento del hepatocito), PGDF (factor plaquetario derivado de crecimiento, albúmina, oxigenasa heme, LDL (proteína de baja densidad), alfa (factor de necrosis tumoral), factor de crecimiento de insulina (IGF-I y/o II), factores de crecimiento de fibroblastos, factores de crecimiento de nervioso (NGF), factor morfógeno muscular (MMF), factor derivado por estroma de alfa-quimocina (SDF)-1, VEGF (factor endotelial vascular de crecimiento celular), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) o receptores, factores hematopoyéticos de crecimiento, heparina, sulfato de heparina, sulfato de condroitina, glicosaminoglicano, anteicoagulantes, agentes trombolíticos, agentes antifibrinolíticos, agentes antiplaquetarios, factores de la coagulación, activador plasminógeno de tejido (t-PA), trombomodulina, quinogen de peso molecular elevado, AT-III, inhibidor de C-esterasa, factor H, eritropoyetina, SCF (factor de crecimiento de células madre), G-CSF (factor de crecimiento de granulocitos), GM-CSF (factor estimulador de granulocitos-macrófagos), factor de complemento, factor de crecimiento derivado mediante plaquetas (PDGF), proteína-1 quimioatraída por monocitos (MCP-1), factor epidérmico de crecimiento (EGF), hormona paratiroidal (PTH), transportador de serotonina o receptor de serotonina o de serotonina o antagonista de agonista de receptor de serotonina, endoglobulinas, factor endotelial de crecimiento celular, factor estimulante, CXC de angiogénesis de células endoteliales quimocinas, HIF-1alfa, angiogenina, factor obligatorio de crecimiento de heparina, factores de crecimiento de péptidos, insulina, IGF (factor de crecimiento de insulina), estrógeno, hormona humana de crecimiento (hGH), folistatina, proliferina, prostaglandina, interleucinas o receptor, globinas, inmunoglobulinas, antígeno histocompatibilizado de tipo antígeno HLA, anticuerpos catalíticos, factores de necrosis tumoral, quimocinas, agente inmunosupresor, antiinflamatorios, antineoplásicos, antibióticos, agentes antifúngicos y antibacterianos, agentes antimicrobianos antivirales, antiinfecciosos, leptinas, interferones, factores estimuladores de colonias, V-MAP, angiopoyetina, receptor de activación del péptido de latencia (como LAP β 1, LAP β 3) para los factores de crecimiento o las citoquinas, VEGF-1, VEGF-2 (KDR), CTGF, Tie-1, Tie-2, SCA, CD133, CD34, CD43, efedrinas, proteínas que controlan la degradación de la matriz como proteínas de tipo metaloproteidasas (MMP), MMP 2, Del 1, alfa HIF-1, proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1), agentes regeneradores oligómeros (RGTA), nicotina, glicosaminoglicano como heparina/sulfato de heparano o sulfato de condroitina/dermatano/queratano, laminina o péptidos que controlan el resto ligando YIGSR de laminina, la secuencia de IKVAV, VAPG de elastina, los dominios de enlace de heparina basados en X-B-B-X-B-X o X-B-B-B-X-X-B-X, secuencias B-B-X-B, en que B es un aminoácido y X es un hidroxiaminoácido, proteoglicanos o moléculas destinadas a unir los proteoglicanos (como el dominio de heparina que une HepII de la fibronectina, por ejemplo), REDV, FSRN, RGD, FHRRIKA, adenosina y inosina sola o en asociación, molécula de adhesión o receptor para la molécula de adhesión (comprendidos, de forma no exclusiva, los ligandos identificados por receptores de integrina pero también otros receptores o co-receptores que median en la adhesión celular).

El agente asociado puede estar unido químicamente, adsorbido, absorbido o libre.

El agente puede estar contenido en el volumen o en el exterior de la estructura principal 3D en un tejido o una estructura principal externa o dispositivo médicoquirúrgico como se define para la estructura principal secundaria y cuyo objetivo es tratar la primera estructura principal o el tejido en contacto con la misma.

El agente puede estar presente en la estructura principal 3D *in vitro* o *in vivo*, antes, durante o después del periodo de implantación de la estructura principal 3D.

El agente puede ser suministrado mediante un sistema externo de contención, dispositivo endovascular o endobronquial, dispositivo de tejidos o endocavitario.

La estructura principal crea en el tejido nichos localizados para depositar un material biológicamente activo. El tejido sirve para concentrar el enlace del material biológicamente activo, como los fármacos que son introducidos localmente o sistémicamente. La estructura principal puede servir también para la liberación de agente bioactivo asociado a la estructura principal.

Una población celular puede estar asociada o no al soporte tridimensional de colágeno modificado. En ciertos casos, la población celular puede proceder de la colonización del soporte por células del hospedante. Las células pueden ser células embrionarias, fetales, neonatales, o adultas. Las células pueden ser células madre, células madre prediferenciadas, progenitores o células diferenciadas o una combinación de las mismas. Las células pueden tener un origen autólogo, células homólogas, heterólogas como células mamíferos.

Las células pueden ser manipuladas genéticamente. El componente celular cuyas células han sido manipuladas puede producir un agente bioactivo. El componente celular en el que las células han sido manipuladas *ex vivo* o *in situ* o en combinación.

El componente celular puede ser obtenido mediante la fusión de diferentes tipos de células de mamíferos o no mamíferos. Las células pueden tener grados diferentes de diferenciación, estar activadas o no, ser de edades diferentes, manipuladas o no o en combinación.

Los diferentes tipos de células pueden estar asociados.

Uno o varios tipos de células pueden estar presentes en la estructura principal 3D. Los diferentes tipos de células no están necesariamente asociados y presentes en el mismo momento en la estructura principal. Las células pueden estar asociadas inicialmente a la estructura principal *in vitro* o *in vivo*. Las células pueden ser cultivadas en la estructura principal *in vitro* antes de la implantación. Las células pueden estar asociadas secundariamente a la estructura principal. Con el fin de colonizar el soporte, las células pueden ser inyectadas, por ejemplo, directamente en la estructura principal, en las proximidades o a distancia. Por tanto, el soporte puede ser, por ejemplo, inyectado por vía endovascular y las células inyectadas de forma simultánea o secundariamente. La presencia de las células *in vivo* puede, en ciertos casos, preceder también a la ubicación de la estructura principal. En ciertos casos, la población celular puede proceder de la colonización del soporte por las células del hospedante. Es posible la asociación de diferentes combinaciones de utilización.

El método incluye, aunque no exclusivamente, células con capacidad potencial contráctil, rítmica o angiogénica como células madre embrionarias humanas, células madre embrionarias derivadas de blastocitos humanos de SCNT (transferencia nuclear), células madre de adulto purificadas de tejido diferenciado: de hígado, de páncreas, de corazón, pulmón, de médula ósea, tejido muscular (liso, cardíaco, esquelético, etc.), progenitores para las células endoteliales o contráctiles aisladas de tejido fetal, neonatal o adulto como célula de Sca1+/- aislada de páncreas, de corazón, de hígado o de cualquier otro tejido fetal, célula prediferenciada *in vitro* o *in vivo*, mioblasto esquelético o miocito, cardiomiocito (fetal, neonatal o adulto), progenitores para el cardiomiocito o el miocito, célula mesenquimal de médula humana, de estroma, células hematopoyéticas, células progenitoras aisladas a partir de sangre de cordón umbilical, leucocitos de sangre y células progenitoras de sangre para cardiomiocitos o células endoteliales (como células CD34+, AC133+), células amnióticas, células de placenta, células trofoblásticas, células basales, células de tejido adiposo o células derivadas, células purificadas a partir de epiplón como células mesoteliales epiploicas, células periosteales, células pericondriales, fibroblastos, células neuronales, células hipocámpales, epidérmicas, células dérmicas, queratinocitos, células granulares, células del sistema inmune, células prediferenciadas (empleando tratamientos eléctricos, hipoxia, hipotermia o congelación, mediante estimulación o retiradas de ciertas quimocinas, productos químicos, biológicos y otros tratamientos físicoquímicos).

En los ejemplos siguientes se describirán las diferentes fases de un modo particular de realización de una matriz de colágeno modificada así como las características de las preparaciones así obtenidas.

Ejemplo 1

Acoplamiento covalente de moléculas de adhesión como péptidos RGD/RGE al soporte colagénico o agentes biológicos como proteoglicanos, factores de crecimiento o citoquinas si la estructura principal está hecha de colágeno.

5 Ejemplo 1

Acoplamiento covalente de moléculas de adhesión como péptidos RGD/RGE al soporte colagénico o agentes biológicos como proteoglicanos, factores de crecimiento o citoquinas si la estructura principal está hecha de colágeno y contiene grupos accesibles tioles, aminos o grupos carboxilos.

El principio de la reacción química de acoplamiento se ilustra en la figura 1. El acoplamiento descrito en la misma permite presentar el resto RGD a una distancia media del soporte, en este caso una matriz de colágeno de 30-40 Angströms, alargamiento favorable para la interacción máxima de la secuencia péptida con el sitio receptor de la integrina (véase Beer JH. *et al.* 1992, Craig WS. *et al.* 1995)^{23, 24}.

Se utilizan soportes colagénicos y, ventajosamente, soportes porosos reticulados mediante DHT como Ultrafoam®, materiales ya autorizados en el campo clínico como hemostáticos: hojas de Ultrafoam® de 5 mm de grosor (2,5 mm después de rehidratación en PBS) (Davol Inc., Cranston, RI) procedente de fibras de colágeno de tipo I y tipo III de ternera reticulado mediante DHT. Las matrices, después de una rehidratación, son despegadas en discos de 8 mm de diámetro y 2,5 mm de grosor utilizando punzones para biopsia cutánea. La concentración de colágeno del soporte después de la rehidratación es de aproximadamente 20 mg/cm³. El tamaño de los poros del soporte se sitúa entre 30 y 200 µm (H. Park 2005)⁵⁶. Los péptidos lineales RGD (por ejemplo, GRGDS) o RGE (Sigma Aldrich) son fijados de forma covalente a la matriz colágena después de la formación de la trama colagénica utilizando un agente reticulante heterobifuncional soluble en agua, como (6-[3'-2-(piridilditio)-propionamido]hexanoato (Sulfo-LC-SPDP) (véase Pierce Biochemical (Rockford, IL, EE.UU.)).

Este agente reticulante heterobifuncional (denominado también reticulador) reacciona mediante su grupo N-hidroxisuccinimido con los grupos aminos presentes en el colágeno. El otro extremo del reticulador que contiene el grupo 2-piridil-sulfuro reacciona, después de la conversión en un grupo tiol mediante ditiotritol, con el péptido de adhesión activado. Este péptido, ventajosamente GRGDS, fue acoplado extemporáneamente con el reticulador sulfo-LC-SPDP en la parte N-terminal del residuo glicina o en el residuo arginina en el caso RGE. Por ejemplo, GRGDS o RGE (soluciones acuosas esterilizadas) (0,1-10 mg/ml) se hacen reaccionar con sulfo-colagénico rehidratado en PBS a pH 7. El exceso de reticulador se separa mediante lavados sucesivos de la matriz en PBS. Las matrices así modificadas son tratadas mediante ditiotritol (DTT) (12 mg/ml en PBS) y el DTT se suprime mediante lavados. En la reacción final, las matrices colagénicas anteriormente tratadas (10 mg) reaccionan con sulfo-LC-GRGDS (0; 0,5; 1 y 2 mg) o sulfo-LG-RGE (1 mg), 48 horas en PBS. El grado de sustitución es controlado alterando las cantidades relativas de los diferentes reactivos con respecto al colágeno y, sobre todo, mediante la medición espectrofotométrica de la piridina-2-tióna procedente de la escisión del reticulador (absorción molar específica = 8,08 x 10³ M⁻¹ cm⁻¹ a 343 nm) (figura 1). Las preparaciones se mantienen esterilizadas y se almacenan a 4 °C.

40 Ejemplo 2

Utilización de soportes colagénicos funcionalizados con moléculas de adhesión para fabricar un tejido contráctil.

45 Células contráctiles

Diferentes tipos de células tienen una actividad contráctil antes o después de una diferenciación completa como, por ejemplo, las células de músculos lisos, células de músculos esqueléticos o cardiomiocitos. Las células madre embrionarias prediferenciadas o no (pudiendo ser el agente de diferenciación, por ejemplo, uno o una combinación de factores de crecimiento. La retirada o inhibición de ciertos factores del medio de cultivo como, por ejemplo, factores de crecimiento de tipo FGF, TGF beta, BMP-2, SDF1, factores físicos como hipoxia, electroestimulación, congelación, tensión mecánica, etc.) han mostrado igualmente su capacidad para favorecer la diferenciación hacia células contráctiles. Células de médula ósea (células hematopoyéticas o células mesenquimales), células aisladas de sangre en circulación (incluidas también las células aisladas a partir de sangre de cordón umbilical). Células con capacidad potencial contráctil han sido también aisladas a partir de tejidos diferenciados (fetales o adultos), tejidos musculares (como mioblastos o cardiomioblastos), progenitores aislados de tejidos adiposos epiloicos, tejidos diferenciados fetales o adultos (como, por ejemplo, de hígado, páncreas, miocardio, pulmón, etc.), líquido amniótico, células modificadas genéticamente, etc.

60 Inserción de células en el soporte colagénico

En este ejemplo se insertaron células contráctiles diferenciadas normalmente utilizadas, cardiomiocitos neonatales de rata (obtenidos mediante digestión de ventrículo cardíaco de rata recién nacida en los dos días siguientes al nacimiento) en matrices colagénicas funcionalizadas o no con péptidos de adhesión. Las matrices colagénicas se obtuvieron mediante DHT. En el ejemplo siguiente se trata de una matriz comercial tipo Ultrafoam® (Bard) pero se pueden utilizar otros tipos de matriz que tengan un componente colagénico. Se insertó así un número considerable

de células 10^7 células/cm³ de matriz colagénica. Como comparación, en el miocardio, el número de cardiomiocitos descrito para el volumen de tejido de miocardio es de $0,5 \cdot 10^8$ cardiomiocitos/cm³ (referencia de M. Radisic *et al.* 2003)¹⁰². Los soportes colagénicos modificados con los péptidos de adhesión (dimensión, 8 mm de diámetro x 5 mm de grosor) fueron inseminados con 2×10^6 cardiomiocitos con el fin de obtener una concentración de $1,5 \times 10^7$ células/cm³. Justo después del depósito de las células, las matrices se centrifugaron a 1.000 revoluciones/minuto durante 6 minutos con el fin de mejorar la eficacia y la homogeneidad de la distribución celular. Las células no unidas presentes en el fondo fueron nuevamente depositadas sobre la superficie superior de la matriz.

Cultivo de estructuras principales celularizadas

Las matrices celularizadas fueron seguidamente transferidas en placas de 12 pocillos y cultivadas en estado estático sin recurrir a biorreactores y utilizando un medio de cultivo clásico de 2 ml de DMEM (medio de Eagle de Dulbecco) enriquecido con 10% de suero de ternera fetal sin utilizar suero de caballo como es habitualmente necesario. Después de 24 h el medio de cultivo se sustituye por DMEM que solo contiene 5% de suero de ternera fetal y que contiene transferrina (10 mg/ml), insulina (1 mg/ml) y selenio. El medio de cultivo se cambia 2 veces hasta el 8º día. Hay que insistir en el hecho de que no son útiles para obtener los resultados obtenidos ninguna matriz extracelular de tipo Matrigel®, estímulos físicos como una electroestimulación crónica o una tensión mecánica, la utilización de un biorreactor o elevadas concentraciones de suero xenogénico de tipo suero de caballo.

Histología

Las matrices celularizadas se fijaron al 8º día en formol al 10% y seguidamente se incluyeron en parafina para una histología normal. Se marcaron secciones transversales de 5 µm con una coloración mediante HES (hematoxilina-eosina-azafrán) para el análisis estructural y para estudiar el número de la distribución de células. Una cierta parte de las matrices celularizadas fue también congelada en nitrógeno líquido para efectuar inmunomarcados. Después de la descongelación, las secciones fueron permeabilizadas con Triton X-100, saturadas con PBS que contenía 3% de albúmina de suero bovino. Los anticuerpos primarios y seguidamente secundarios conjugados a un marcador fluorescente (Alexa) fueron seguidamente incubados con las secciones. Las matrices RGD modificadas fueron así incubadas con un anticuerpo de ratón dirigido contra actinina alfa (concentración de utilización en dilución 1:500 (Sigma)) y un anticuerpo antirratón conjugado a alex-546 (Molecular Probe) (dilución 1:300). Los núcleos de las células recibieron un marcado específico en DAPI.

La inserción de los cardiomiocitos neonatales de rata en una matriz colagénica modificada con péptidos de adhesión permite realizar un implante que se contrae espontáneamente después ≈ 2 -3 días de cultivo *in vitro*. En el 8º día, se observa una actividad contráctil en un 50% de los implantes colagénicos en ausencia del resto RGD y en un 80% en presencia ($p = ns$). De forma interesante, los latidos espontáneos son más rápidos en presencia del resto RGD, 141 ± 17 frente a 61 ± 26 (diferencia significativa de $p < 0,05$). Cuando estos latidos están presentes, generalmente son más regulares en las matrices colagénicas modificadas.

Se presentan diferentes parámetros de contractilidad en la figura 2, en lo que se refiere a los parámetros de contracción o en la figura 3 en lo que se refiere a los parámetros de relajación. Las actividades espontáneas sin estimulación eléctrica (Estim-) o bajo estimulación eléctrica (Estim+) fueron registradas según la técnica de Y Lecarpentier *et al.*¹⁰³⁻¹⁰⁵. Los histogramas oscuros corresponden a las matrices colagénicas de base y los histogramas claros a las matrices colagénicas funcionalizadas con restos RGD. Los registros se efectuaron en el 8º día.

Las figuras 2a y 2b muestran el efecto de una estimulación eléctrica sobre las matrices. Los parámetros medidos fueron de forma indiferente la fuerza desarrollada medida en microneutons (a saber, "tensión activa") o los acortamientos (ΔL). Como se observa cuando la frecuencia de estimulación eléctrica aumenta, disminuyen las fuerzas desarrolladas lo que se plasma en un efecto de estancamiento negativo. No obstante, cualesquiera que sean las frecuencias de estimulación ensayadas, las fuerzas desarrolladas en presencia del resto RGD son superiores a las fuerzas desarrolladas en su ausencia (figura 3a). La fuerza desarrollada es máxima para una frecuencia de 0,17 Hz. En efecto, existe un umbral de estimulación eléctrica de las matrices en función de la frecuencia. Se ha observado incluso que para una misma intensidad de estimulación, el umbral de frecuencia de estimulación es más bajo para las matrices con RGD. Las respuestas mecánicas son también mejores en presencia del resto RGD (p significa para cada vez $p < 0,05$) (figura 2b). Para las matrices RGD, los umbrales de estimulación son muy bajos (inferiores a 3 V/cm). Estos umbrales del mismo orden de magnitud que la despolarización espontánea medible a nivel del miocardio. La capacidad del tejido contráctil implantado para sincronizarse con el miocardio nativo del paciente será mayor cuanto más bajo sea el umbral de estimulación de este tejido, como es el caso en presencia de RGD. Los diferentes parámetros de contractilidad espontánea que han sido medidos se mejoran igualmente en las matrices RGD + ($p < 0,01$) para los parámetros de acortamiento (ΔL) (figura 2c) como para la intensidad de las fuerzas desarrolladas ("tensión activa") (figura 2e). De forma interesante, con la modificación de la matriz, las fuerzas medidas fueron superiores a todas las recogidas en la bibliografía. Para una frecuencia óptima de estimulación, la presencia del resto RGD supone un aumento en un factor de 3 veces de ΔL ($31,1 \pm 3,1$ frente a $9,4 \pm 3,9$ Δm (es decir, RGD- frente a RGD+, respectivamente, $p < 0,05$). Esta diferencia persiste incluso cuando las

matrices son estimuladas (figura 2c, e, Estim+ frente a Estim-). Las figuras 2d y 2f recogen algunos datos sobre las velocidades de desarrollo de estas fuerzas o sus acortamientos en función del tiempo. Se observa que tanto la velocidad de acortamiento máxima (maxVc: velocidad max de contracción) (figura 2d) como el máximo de la fuerza desarrollada en un tiempo dado (figura 2f) son también superiores en las matrices RGD. La velocidad máxima de

contracción maxVc ($633,0 \pm 180,8$ frente $56,8 \pm 23,1$ Am/s (es decir RGD- frente RGD+, respectivamente, $p < 0,05$) y los alargamientos o la disminución de la tensión molecular. Además, como para los parámetros de contracción, la intervención de esta velocidad máxima de relajación maxVr y la velocidad $-Df/dt$ "disminución de la tensión activa" (figura 3d) es superior en las matrices modificadas. Esta diferencia persiste igualmente bajo una electroestimulación.

Las figuras 3a y 3b comparan las velocidades de contracción maxVc y de relajación maxVr en las matrices colagénicas de base, figura 3a, o en las matrices modificadas con los péptidos RGD, figura 3b. Para los dos tipos de matrices existe una correlación lineal importante entre las velocidades de contracción y de relajación. Estas velocidades además son prácticamente iguales para un tipo de matriz dado. La contracción es un fenómeno activo provocado por la contracción de las células. La relajación por otra parte es un fenómeno pasivo que puede proceder de la flexibilidad elástica del soporte matricial o un fenómeno activo debido a las células. Las propiedades mecánicas de las matrices básicas no celularizadas RGD son más o menos iguales. La diferencia obtenida en la relajación entre las matrices RGD+ y RGD- por tanto no puede proceder de una diferencia de elasticidad de los dos tipos de matrices, sino de la población celular asociada a la matriz que es responsable de la diferencia observada. Esto es también interesante, dado que las velocidades de contracción y de relajación son muy parecidas, por lo que se deduce que el efecto de la matriz es prácticamente nulo tanto en lo que se refiere a la inercia de la matriz durante la contracción como a una eventual elasticidad durante la relajación. Los parámetros de contracción así como los de relajación son fundamentales para el rellenado del miocardio durante la diástole.

El análisis histológico de las diferentes matrices confirma una mejor diferenciación de las células contráctiles en las matrices RGD. Después ocho días, los tejidos colagénicos sin RGD no contienen prácticamente células redondas poco diferenciadas, con prácticamente ningún contacto con la matriz. Por el contrario, los cardiomiocitos asociados a las matrices RGD+ están mucho más alineados, alargados con un núcleo bien regular y centrado. Además, los cardiomiocitos en las matrices colagénicas (RGD+) tienen un reagrupamiento no del todo anárquico, organizados alrededor de las fibras de colágeno a las que se adhieren fuertemente. La evaluación del número de células en las matrices para FACS muestra que el número de células disminuyó en el cultivo. No obstante, está bajada es de un factor de 6 después de 8 días en las matrices colagénicas mientras que es de solo un factor 2 con las matrices RGD+ ($p < 0,05$ RGD+ frente a RGD-). Por tanto, las matrices RGD+ contienen un número más considerable de células a los 8 días con respecto a las matrices RGD- ($0,67 \times 10^6$ frente a $0,20 \times 10^6$ células RGD+ frente a RGD-, respectivamente, $p < 0,05$). De la misma manera, sobre los cortes de histología en confocal después de un marcado del núcleo con DAPI, las matrices celularizadas RGD+ tienen un número más considerable de núcleos por sección sobre los cortes histológicos. De forma muy importante, las estriaciones transversales (cross striations) de los cardiomiocitos que son el testigo de la organización terminal del aparato contráctil de los cardiomiocitos fueron detectados sobre los constructos RGD+ pero no con los constructos RGD-. Las modificaciones morfológicas de las células no son función del número de células iniciales ni de la densidad celular para una preparación dada. Esto tiende a demostrar que las diferencias observadas están asociadas principalmente a una interacción de las células con el soporte y no a una diferencia de interacción de las células entre ellas.

Estos resultados demuestran sin duda que la fijación de las moléculas de adhesión como los péptidos RGD sobre el colágeno puede mejorar la adhesión, la supervivencia y la diferenciación de células contráctiles y mejorar así las propiedades contráctiles tanto espontáneas como en caso de estimulaciones eléctricas de tejidos de miocardio, fabricadas a partir de estos soportes. Los rendimientos mecánicos mejoran así como los rendimientos eléctricos. Los tejidos son más estables eléctricamente, con umbrales de estimulación más bajos.

Ejemplo 3

Inducción de una angiogénesis *in vitro* por la asociación de células endoteliales en una matriz funcional con moléculas de adhesión:

En otro tipo de preparación, las células de interés como las células endoteliales (maduras o progenitoras) pueden ser trasplantadas en la matriz colagénica 3D funcionalizada con moléculas de adhesión, ventajosamente el resto RGD en presencia o no de células contráctiles o de otros tipos de células como, por ejemplo, fibroblastos, queratinocitos, células contráctiles, células modificadas genéticamente, etc., que pueden ser utilizadas también independientemente. Este soporte favorecerá la supervivencia y la diferenciación de esta población celular asociada, como lo harían las células endoteliales. Esta población celular puede ser utilizada en asociación con células contráctiles o de forma aislada. El soporte puede ser también utilizado en ciertos casos sin población celular inicialmente asociada, colonizando las células secundariamente el soporte. No obstante, se ha demostrado que la asociación de células endoteliales favorece la supervivencia y la diferenciación de células contráctiles implantadas en soportes 3D DA Narmoneva *et al.*, 2004³² y que la prevascularización *in vitro* de tejido muscular esquelético favorece su supervivencia después de la implantación (véase S. Levenberg *et al.* 2005)¹⁰¹.

Los tejidos 3D fabricados *in vitro* generalmente no tienen el retículo vascular que existe en los tejidos naturales. Por

tanto, para que constituya una realidad clínica, un tejido contráctil fabricado *in vitro* debe ser capaz de favorecer su neovascularización favoreciendo el desarrollo de una vascularización a partir de la vascularización previamente existente del receptor o favoreciendo la diferenciación de una población de células endoteliales asociadas al soporte 3D inicialmente o posteriormente recogidas en este soporte después de la implantación. Por tanto, una de las propiedades más importantes para un tejido fabricado *in vitro* será su capacidad para favorecer su troficidad y el desarrollo de vasos en el interior con el fin de limitar al máximo el periodo isquémico obligatorio que sigue a la implantación y que es responsable de una mortalidad celular considerable con pérdida de su funcionalidad (RY Kannan *et al.* (2005))³⁵. Esto se hace aún más crítico cuando se tiene interés en células particularmente sensibles a la hipoxia como células contráctiles de tipo cardiomiocitos y cuando, además, estas células son trasplantadas en una zona en la que la vascularización ya ha sido inicialmente alterada (miocardio isquémico o necrótico). La prevascularización del implante y la ausencia de necesidad de utilizar geles en este tipo de soporte permiten favorecer la libre difusión de los nutrientes y, por tanto, fabricar tejidos de grosores superiores. Además, en este espacio, el microentorno celular puede ser controlado y modificado así como la respuesta del organismo. Es posible asociar este soporte a agentes o trasplantar en este tipo de soporte 3D células transformadas con genes que codifican estos agentes, como en el caso presente para factores de crecimiento implicados en la regulación de la angiogénesis. Obviamente pueden estar asociados otros genes y esto de forma no exhaustiva como los que están destinados, entre otras cosas, a favorecer la adhesión, supervivencia, crecimiento, alojamiento, proliferación, apoptosis o diferenciación de las células en el interior, las proximidades o también a distancia del soporte 3D. Están incluidos también los genes que controlan la degradación o la elaboración de la matriz extracelular, o genes que pueden controlar la despolarización de células para conferirles una actividad rítmica, genes que codifican factores reguladores de la respuesta inmune, inflamatoria o tumoral.

Asociación del soporte con "células endoteliales"

A diferencia del número muy considerable de células contráctiles necesario para obtener un tejido contráctil de aproximadamente $0,5 \times 10^7$ células/cm³, el número de células endoteliales necesario es mucho más bajo de aproximadamente 10^6 células/cm³. Se trasplantaron células endoteliales diferenciales maduras de ratón (descritas por Arbiser *et al.* 1997) en la matriz colagénica Mile Sven1 (MS1) (ATCC nº CRL-2279). Se dispusieron diferentes concentraciones de células MS1 de 10^4 a 10^7 en los soportes colagénicos de tipo matriz colagénica funcionalizada o no con moléculas de adhesión, ventajosamente el resto RGD (RGD+ (TR) o RGD- (T), pero también péptidos agonistas/antagonistas como RGE y cultivados en DMEM con L-glutamina 4 mM, 1,5 g/l de bicarbonato de sodio, 4,5 g/l de glucosa, piruvato de sodio 1 mM, penicilina, estreptomycin y 5% de suero de ternera fetal (FCS) (Hyclone, Logan, Utah) en placas de cultivo de 12 pocillos en un incubador a 37 °C con una atmósfera de 5% de CO₂ para periodos de 3 y 6 semanas. Se estudió el desarrollo de la angiogénesis *in vitro* mediante microscopía electrónica. Las formaciones vasculares no son visibles a los bajos aumentos obtenidos con los microscopios clásicos y la presencia de estructuras vasculares debe ser demostrada con un aumento mayor recurriendo al microscopio electrónico (EM).

Para la microscopía electrónica, las preparaciones se fijaron en paraformaldehído, 1,5% de glutaraldehído y calcio 1 mM en tampón de cacodilato de sodio (pH 7,2) a 4 °C y seguidamente se fijaron en un tampón con 1% de OsO₄ a 4 °C y se fijaron en bloque con acetato de uranilo al 1% en etanol al 50% antes de ser incorporados en resinas de Epón/araldita (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington PA). Se realizaron secciones más finas (60 nm) y se colorearon con acetato y citrato de uranilo. Todas las muestras se examinaron utilizando un microscopio electrónico CM-100. La búsqueda de formaciones vasculares se efectuó en un microscopio con un aumento de (4k) y las estructuras vasculares se confirmaron gracias a un aumento mayor para identificar las uniones comprimidas y la presencia de membrana basal haciendo variar la incidencia de la radiación Rx si fuera necesario. Una luz vascular se define como un espacio cerrado delimitado por células endoteliales que interaccionan y por uniones citoplásmicas elaboradas de tipo "tight junction". Se cuantificó el número de estructuras vasculares por mm², el grado de complejidad de los vasos se evaluó mediante la medición de la relación nucleocitoplásmica de las células implicadas, por el número medio de células que participan en la formación de una luz y por el % de ramificación definido por el número de luces contiguas y el número medio de estructuras vasculares en caso de ramificación. El análisis estadístico recurre a los ensayos para series emparejadas tipo Wilcoxon Matched-Pairs Signed-Ranks Test.

En la matriz colagénica funcionalizada con los péptidos RGD, las células modificaron su aspecto morfológico haciéndose mucho más extendidas a las 3 y 6 semanas. Una interacción de las células con la matriz a través de la molécula de adhesión es responsable de esta modificación morfológica de la célula, ya que esta modificación del aspecto no es función del número inicial de células y no está presente en las matrices colagénicas básicas o en las matrices funcionalizadas con RGD. Además, esta modificación desaparece si la forma soluble del resto RGD está asociada al medio de cultivo. En la matriz RGD, las células endoteliales están polarizadas. Por otra parte, existe en otros lugares una membrana basal entre las células y la matriz. Esta membrana basal no está presente si las células se cultivan en matrices colagénicas no funcionalizadas. Como la obtención de las estructuras de tipo vascular *in vitro* en microscopio clásico ("capillary-like network") en las matrices colagénicas necesita normalmente la presencia de un agente de diferenciación como PMA (véase Ilan, 1998)³⁶ o la presencia de fibroblastos (véase Black, 1998)¹⁰⁶ o un medio enriquecido con factores secretados fibroblastos (véase Montesano, 1993; Baatout, 1997)^{107, 108}, las verdaderas estructuras vasculares se desarrollan espontáneamente en las matrices RGD como se observa en microscopía electrónica con una media de 8,5 "estructuras vasculares" por mm² +/- 1,3 a las 6 semanas (n = 5

experiencias separadas) (figura 4a). Al mismo tiempo, ninguna de estas estructuras está presente en los otros tipos de matriz (figura 4a). La mayoría de las "luces vasculares" están formadas por las prolongaciones citoplásmicas y no por el cuerpo celular que contiene el núcleo. Un estudio cuidadoso de más de 40 estructuras vasculares en las matrices RGD+ muestra que el número medio de células implicadas en la formación de una luz vascular era de 5,5 +/- 1,1 (véase la fig. 4b). En ciertos casos, las luces vasculares están formadas por más de 10 células endoteliales interconectadas. Un 23,6% de los vasos se consideran como ramificados (figura 4a, parte sombreada) con un número de luces vasculares de 3 +/- 0,5 en caso de ramificación.

Ejemplo 4

Posibilidad de implantar células modificadas genéticamente que son capaces de secretar un agente en el soporte colagénico funcionalizado:

En el ejemplo siguiente las células trasplantadas en la matriz pueden ser modificadas genéticamente para liberar un agente biológico implicado, por ejemplo en la angiogénesis, el desplazamiento, la supervivencia, la proliferación, la apoptosis, la diferenciación, el control de la degradación, de la elaboración de la matriz extracelular, el control de la respuesta inmunitaria, inflamación o tumoral, etc. Se mostró que era posible modificar genéticamente células contráctiles como mioblastos con genes implicados en la angiogénesis como VEGF, angiopoietina, etc., con el fin de obtener tejidos de mejor calidad después del trasplante (D.E. Coppi *et al.* (2005))¹⁰⁹. En el presente caso, las células de tipo endotelial (es decir, MS1) fueron modificadas mediante transfección viral con el gen de activación Ras +. La vía Ras/Map quinasa se describió como una vía de activación muy importante en el control de la angiogénesis (Ilan *et al.* 1998)³⁶. Las células MS1 Ras+ son conocidas con el nombre de SEVN 1 ras (SVR) (ATCC n° CRL-2280) (véase Arbiser, 1997)¹¹⁰. Las células SRV (figura 5) fueron implantadas y cultivadas en diferentes matrices como anteriormente durante 6 semanas. El ejemplo muestra que la actividad biológica de las células puede ser modificada mediante manipulación genética y que no obstante sigue siendo posible funcionalizando las matrices con moléculas de adhesión, ejercer una influencia sobre su comportamiento y su grado de diferenciación. La transformación de células endoteliales con Ras aumenta su capacidad potencial angiogénica ya que las estructuras vasculares y la presencia de membranas basales son visibles incluso en las matrices colagénicas básicas (T) con aproximadamente 7 estructuras vasculares/mm² (figura 5a). Pero incluso con este tipo de células, la angiogénesis sigue estando mucho más desarrollada si estas células son introducidas en matrices funcionalizadas con moléculas 8TR) (figura 5b). La presencia de las moléculas de adhesión permite obtener una angiogénesis más desarrollada tanto en cantidad (número de estructuras vasculares/mm² ((40 frente a 7) (RGD+ frente a RGD-) (p significativo)) (figura 5a) como también en calidad (% de vasos ramificados ((75% frente a 10%) (RGD+ frente a RGD-) (p significativo)) (figura 5a), nivel de complejidad de los vasos particularmente con una relación nucleocitoplásmica más baja y un número de células implicadas en cada luz vascular más elevada ((4,5 frente a 3) (RGD+ frente a RGD-)) (ns) (véase la figura 5b).

Ejemplo 5

Evaluación del interés de la fijación covalente de la molécula de adhesión sobre el soporte colagénico

Para estudiar la importancia de la fijación al soporte en el efecto observado, se ensayaron la forma soluble del resto RGD o la simple adsorción del resto RGD en presencia de células contráctiles o de células endoteliales en soportes colagénicos. Las elevadas concentraciones de RGD de 1 a 1.000 µg/ml han sido asociadas al medio de cultivo o adsorbidos sobre la matriz durante más de 24 h antes de la implantación de los diferentes tipos de células. En todo caso, el efecto ventajoso del resto RGD sobre la diferenciación y la supervivencia de las células endoteliales o de los cardiomiocitos es evidente. Además, incluso aunque las células se cultivaran en un soporte colagénico modificado con el péptido de adhesión, la presencia de la forma soluble del resto RGD en el medio inhibe este efecto (figura 5a).

Ejemplo 6

Utilización de la matriz funcionalizada con moléculas de adhesión en presencia de un agente biológico

Algunos de estos agentes como, por ejemplo, los factores de crecimiento, pueden estar simplemente asociados al medio de cultivo *in vitro*, adsorbidos sobre el soporte colagénico (véase EJ Suuronen *et al.* (2003))⁵⁴ o incluso fijadas de forma covalente utilizando o no el medio que ha sido propuesto. La matriz también puede ser funcionalizada con proteoglicanos, por ejemplo, que tienen la propiedad de retener los factores de crecimiento. Algunos de estos agentes pueden ser, por ejemplo, factores de crecimiento, agentes estabilizantes de los factores de crecimiento (como, por ejemplo, "oligomeric regenerating agents" (RGTA)), quimocinas, agentes destinados a aumentar la contractilidad, agentes que aumentan la angiogénesis, que controlan la reacción inflamatoria, que controlan sin degradación o favorecen su polimerización, etc. El agente puede estar presente en el soporte o ser administrado a la periferia del soporte en un dispositivo asociado destinado, por ejemplo, a controlar la remodelación ventricular o tratar un miocardio patológico. El soporte puede servir también para suministrar o concentrar, o mantener estos agentes en un lugar dado. El agente puede ser producido también por las células asociadas al soporte de forma natural o después de la modificación. Los factores de crecimiento son normalmente utilizados a concentraciones de 1 fg/ml a 1 mg/ml (es decir 1-10 nM) (véase EJ Suuronen *et al.* (2003))⁵⁴, pero se pueden utilizar concentraciones

diferentes.

En este ejemplo, el agente asociado es un factor de crecimiento destinado a aumentar la angiogénesis como el clásico VEGF. El factor de crecimiento ha estado asociado al medio de cultivo, pero este factor puede estar también simplemente adsorbido sobre el colágeno durante algunas horas antes de su inserción en las células o de ser fijado por su sitio NH₂, por ejemplo.

La presencia de VEGF (VEGF164 (R&D, Minneapolis, MN) a concentraciones de 4 ng/ml induce la diferenciación de las células MS1 con la aparición de estructuras vasculares en las matrices de colágeno básico (T) y esto es así incluso en ausencia de funcionalización con moléculas de adhesión (figura 6a). No obstante, el número absoluto de estas estructuras sigue siendo bajo (una media de 3/mm²), igual que su nivel de complejidad: únicamente 2,5 +/- 0,5 células (n= 12) por luz vascular (figura 6b), con vasos de paredes gruesas (prácticamente sin prolongación citoplásmica), solamente un 10% de las estructuras son ramificadas (figura 6a) y en caso de ramificación, con únicamente 2 luces vasculares en continuidad. Es conocido que los vasos obtenidos con VEF no están perfectamente formados y tienen una tendencia a favorecer extravasaciones vasculares. En presencia del resto RGD (TR) por el contrario, la densidad de las estructuras vasculares aumenta 8,7 +/- 0,7/mm² (figura 6a), igual que su nivel de complejidad: número de células por luz vascular 4 +/- 1,1, 25% de ramificaciones, 3,5 luces contiguas en caso de ramificación (figura 6a-b).

Ejemplo 7

Los soportes colagénicos funcionalizados con moléculas de adhesión como péptidos RGD tienen un efecto antiapoptótico sobre las células a las que están asociados

Los receptores integrínicos, además de su función en la adhesión de las células a su entorno, desempeñan una función clave limitando la muerte celular por apoptosis y aumentando los genes de supervivencia (Meredith *et al.* 1997)¹⁸. De hecho, la mayoría de las células adherentes como los cardiomiocitos, cuando pierden el contacto con la matriz circundante, se hacen apoptóticas (D. Kuppaswamy *et al.* (2002))¹⁷. Una parte de la muerte celular podría ser debida a la inhibición de esta interacción. Esta es probablemente una de las razones por la que la inyección de células solas en los tejidos es poco eficaz y está acompañada de una mortalidad muy considerable de aproximadamente 95%, lo que justifica la utilización de una matriz 3D en el momento de la inyección para volver a crear este entorno. No obstante, es necesario que el soporte 3D posea igualmente propiedades mecánicas y los ligandos específicos necesarios para esta interacción en el sistema 3D.

La apoptosis ha sido estudiada *in situ* utilizando un microscopio confocal tipo Zeiss con un programa para integrar los datos (MRC 1024, Biorad). Las membranas de las células en la matriz fueron marcadas *in situ* utilizando una coloración Dye red. Las células apoptóticas fueron marcadas utilizando un marcado fluorescente verde antianexina V (FITC). Se realizó una cuantificación de la apoptosis comparando la superficie de fluorescencia roja correspondiente al conjunto de las células con la fluorescencia verde correspondiente a las células apoptóticas. Las membranas de las células en matriz se marcaron *in situ* utilizando una coloración Dye red. Las células apoptóticas fueron marcadas utilizando un marcado fluorescente antianexina V (FITC). Se realizó una cuantificación de la apoptosis comparando la superficie de fluorescencia roja correspondiente al conjunto de las células con la fluorescencia verde correspondiente a las células apoptóticas.

Después de 3 semanas, el porcentaje de células MS1 apoptóticas en las matrices funcionalizadas con el resto RGD es de 10% contra más de un 80% en ausencia de este resto. De la misma manera que se informó para la diferenciación celular, la presencia de la forma soluble del resto RGD en el medio anula este efecto en los dos tipos de matrices funcionalizadas o no con el resto RGD, recuperando la apoptosis su valor de 80%. A esto se debe la necesidad de que el resto sea fijado. La baja supervivencia de células endoteliales en diferentes tipos de soporte 3D colagénico (véase Ilan *et al.*, 1998, Satake *et al.*, 1998, Goto *et al.*, 1993)^{36, 37, 39} o de tipo Matrigel (véase Ranta *et al.* 1998)³⁸ ya ha sido descrita por diferentes grupos. La presencia de un resto RGD fijado sería un medio para disminuir esta muerte celular en este tipo de soporte y mejorar la eficacia de estos trasplantes celulares después de la inyección.

Ejemplo 8

Control de la biodegradación del soporte colagénico mediante un tratamiento no citotóxico compatible con la terapia celular: fijación mediante glutraldehído asociado a la utilización de un proteoglicano como heparina o la utilización de genipina

El método más eficaz para fijar el colágeno continúa siendo una reticulación química mediante glutaraldehído. No obstante, el glutaraldehído se puede polimerizar y despolimerizar lentamente liberando glutaraldehído libre que es tóxico para la célula.

Fijación del tejido con glutaraldehído seguida de tratamiento con quitosano y heparina modificada (matrices de colágeno-glut/GAG)

La fijación mediante glutaraldehído se hace mediante incubación de soportes colagénicos Ultrafoam® en tampón de NaCl (50 mM) que contiene 0,625% de glutaraldehído durante un mes a 37 °C. Después del lavado, los soportes colagénicos se colocan en una solución de 0,2% de quitosano (Sigma Aldrich) más 1% de glicina (Sigma Aldrich) y sulfato de gentamicina al 0,02% (Sigma Aldrich) durante dos semanas a 20 °C. Se prepara una solución de heparina parcialmente degradada mediante la acción de nitrito de sodio en presencia de ácido clorhídrico (1 M, pH 2,0) a 4 °C 3 h sobre sulfato de heparina. La solución se lleva seguidamente a pH 7,4 mediante sosa N y los soportes de colágeno se ponen en contacto con la solución durante 12 h. Las preparaciones de colágeno se lavan seguidamente con tampón de NaCl (50 mM) y seguidamente se ponen en contacto 6 h a 20 °C con una solución de cianoborohidrato de sodio (Sigma Aldrich) al 1% en un tampón de NaCl (50 mM) preparado el día anterior. Las preparaciones de colágeno se lavan nuevamente y se mantienen en una solución que contiene 1% de glicina y 0,02% de sulfato de gentamicina hasta su utilización final.

Fijación mediante genipina (matrices de colágeno/genipina)

La utilización de genipina para fijar tejidos de nueva aportación o descelularizados ya ha sido propuesta (patente de EE.UU de material biológico acelular químicamente tratado con genipina Sung Hsing-Wen *et al.* 2003). Se ha seguido el modo operatorio propuesto por los autores.

La genipina (Challenge Bioproducts CO., Taiwan) fue utilizada a 0,625% en PBS, pH 7,4, a 37 °C durante 3 días.

Evaluación *in vivo* de matrices colagénicas tratadas con los procedimientos anteriores

Se implantaron diferentes tipos de matrices a nivel de los músculos de la médula espinal de ratas anestesiadas. Los análisis histológicos después de 10 días han puesto de manifiesto una infiltración masiva de las matrices colagénicas básicas por células inflamatorias con una degradación intensa y precoz de la trama colagénica y sustitución de esta matriz por la fibrosis poco vascularizada.

En matrices de colágeno-glut/GAG, todo como en las matrices de colágeno/genipina, la infiltración celular está limitada a la periferia de la matriz. De forma interesante, estas matrices favorecen el desarrollo de una angiogénesis considerable en las proximidades de la matriz, aunque la penetración de los vasos en el interior de la matriz queda limitada. La presencia de proteoglicanos en la matriz, que se conoce que favorecen la adsorción y la penetración de factores de crecimiento, podría explicar en parte el aumento de la angiogénesis local. Después de 1 mes, las matrices colagénicas 16/16 desaparecieron incluso las que tenían un diámetro inicial más considerable (8 mm). Por el contrario, todas las matrices de colágeno-glut/GAG, n= 16 o colágeno/genipina, n= 16, presentan una dimensión inalterada (p significativa) y la infiltración celular queda limitada a la periferia. Por otra parte, las células inflamatorias están poco representadas en esta infiltración.

Ejemplo 9

Funcionalización de soporte de colágeno-glutaraldehído/GAG o colágeno/genipina mediante la fijación de molécula de adhesión:

Esta asociación permite controlar la respuesta inflamatoria o inmune con respecto a un tejido y seleccionar su colonización por células de interés.

La posibilidad de modificar las matrices con péptidos de adhesión ha sido también validada. Estas moléculas de adhesión pueden ser asociadas antes o después de los agentes de reticulación de colágeno. Los péptidos de adhesiones como RGD fueron fijados sobre matrices de colágeno Ultrafoam® utilizando el modo operatorio descrito en el ejemplo 1 y seguidamente las matrices fueron fijadas siguiendo los métodos descritos en el ejemplo 8. Después de un aclarado den PBS, estas matrices fueron implantadas en los músculos de la médula espinal de ratas anestesiadas. Fueron implantadas así hasta 8 matrices en el mismo animal.

Después de 10 días y 1 mes de implantación, todas las matrices de glut/GAG están todavía presentes con poca resorción, mientras que en ausencia de tratamiento mediante glutaraldehído, todas las matrices colagénicas funcionalizadas o no con el resto RGD ya habían desaparecido. Los análisis histológicos después de 10 días pusieron de manifiesto una infiltración masiva de las matrices colagénicas básicas mediante células inflamatorias con una degradación intensa y precoz de la trama colagénica y sustitución de esta matriz por la fibrosis poco vascularizada. El tratamiento mediante glut/GAG limita la infiltración celular inicial de la matriz por células inflamatorias y la degradación de la matriz se retrasa con una angiogénesis que queda limitada a la periferia. De forma muy interesante, en presencia de restos de adhesión como los restos RGD (matrices colagénicas-glut/PGA), los vasos penetran esta vez al interior de la matriz así como las células de los tejidos circundantes incluso muy rápidamente ya que después de solamente 10 días de implantación, las 2/3 partes externas de la matriz ya están colonizadas y vascularizadas. Un análisis de la cinética de la angiogénesis de las matrices gracias a la técnica de cuantificación de la angiogénesis utilizando la inyección intravascular de un marcador fluorescente ISL-B4 (Molecular Probes) confirma que las matrices resultan vascularizadas y que esta angiogénesis comienza en la segunda semana

para alcanzar un valor de plataforma de aproximadamente 6% después de 3 semanas. Otros experimentos para periodos de tiempo más prolongados confirmaron que esta angiogénesis solo aumenta lentamente pero que, contrariamente a la que tiene lugar con otros tipos de soportes como las matrices Matrigel®, esta angiogénesis no tiene una tendencia a disminuir después de algunos meses. Debe apreciarse que la cantidad de angiogénesis en las matrices debe ser comparada a la observada en los músculos circundantes como los músculos de la médula espinal en la que esta angiogénesis de aproximadamente 3% +/- 1%.

Existe una colonización celular de la matriz que no es el caso especialmente de las células inflamatorias. Esta propuesta es muy interesante ya que propone un primer tratamiento destinado a evitar la colonización celular de un soporte 3D para seguidamente seleccionar a través de las moléculas de adhesión escogidas las células de interés como, por ejemplo, células endoteliales. La presencia de una neoangiogénesis intensa en las matrices de colágeno-glut/GAG modificadas con los péptidos de adhesión muestra una biocompatibilidad muy buena de este tipo de implante y sugiere una toxicidad baja compatible con su utilización en terapia celular.

Ejemplo 10

Utilización de soportes colagénicos reticulados y funcionalizados o no con moléculas de adhesión como los péptidos RGD para la terapia celular

Se analizó la capacidad de las células trasplantadas para sobrevivir y diferenciarse en este tipo de soportes. Células humanas o no y más o menos diferenciadas: células madre, células progenitoras, células maduras, células modificadas o no genéticamente, fueron así implantadas en diferentes tipos de soportes funcionalizados o no con péptidos RGD. La participación de estas células en la angiogénesis de los soportes fue evaluada en un modelo de implantación de soporte en tejidos musculares (tipo músculos esqueléticos) y se desarrolló un método de análisis cuantitativo de la angiogénesis en estos soportes:

Células:

- Células endoteliales maduras de ratón MS1.

- Células endoteliales maduras de ratón modificadas genéticamente SVR.

- Células madre de ratones aisladas a partir de tejidos diferenciados. Recientemente se ha informado el aislamiento y la caracterización de progenitores para las células endoteliales aisladas en tejidos diferenciados durante el desarrollo del ratón (véase S. Cherqui, SM. Kurian, O. Schussler *et al.* (2006))¹¹¹. Estos progenitores fueron aislados a partir de la fracción de células que tienen una baja capacidad de adhesión a partir de extractos de hígado de ratones neonatales digeridas enzimáticamente mediante colagenasa. Las células fueron recogidas el 8º día de cultivo *in vitro*.

- Células endoteliales maduras humanas aisladas a partir de la pared de las venas de cordón conocidas con la denominación "HUVEC".

- Progenitores de origen humano para la célula endotelial aislados a partir de sangre de cordón umbilical. Estas células fueron preparadas como ya se describió anteriormente (véase Crisa *et al.* (1999) y Hildbrand *et al.* (2004))^{112, 113}.

Modelo de angiogénesis *in vivo*

Los diferentes tipos de células endoteliales se insertaron en matrices tratadas con glutaraldehído/GAG y modificadas o no con péptidos de adhesión como péptidos RGD. Ratones inmunodeprimidos fueron anestesiados con pentobarbital y las matrices fueron implantadas en sus músculos de la médula espinal durante periodos de hasta 6 semanas. Se implantaron así ocho matrices por ratón. Se pudieron ensayar así diferentes combinaciones en el mismo animal. Las matrices fueron explantadas después de diferentes periodos de tiempo y se cuantificó la angiogénesis en las matrices.

Cuantificación de la angiogénesis *in vivo*

Se desarrolló una técnica fiable y reproducible para la cuantificación de la angiogénesis *in vivo*. Los vasos sanguíneos fueron marcados *in vivo* con un marcador fluorescentes anticélulas endoteliales de ratón MCA32 (Universidad Iowa, EE.UU.) o ISL-B4 (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Después de cortar las secciones (200 µm) utilizando una cuchilla oscilante "Automatic Oscillating Tissue Slicer" (OTS-4000) (Electron Microscopy Sciences) se utilizó una transiluminación a través de cualquier grosor de la matriz para evaluar la angiogénesis en un volumen de tejido dado. Se estudió entonces la fluorescencia utilizando un microscopio de fluorescencia clásico y se digitalizó la intensidad de la fluorescencia. En función de la intensidad de la fluorescencia, pudieron ser reconocidos los vasos sanguíneos. La variabilidad dentro o entre los observadores es de menos de 10% para una muestra dada. Se efectuaron comparaciones estadísticas utilizando ensayos de tipo ANOVA o ensayos t de Student.

En ausencia de una población celular asociada, la angiogénesis en la matriz colagénica permanece baja en aproximadamente 8% (figura 7 (T o TR)). La presencia de células endoteliales de tipo MS1 aumenta la angiogénesis en la matriz colagénica en aproximadamente 14% (figura 7) (TS + MS1). Este aumento es incluso más apreciable si la matriz es funcionalizada con péptidos RGD, 35% (p significativo) (véase la fig. 7 (TR + MS1)). En presencia de la forma transformada de MS1 (es decir, SVR), la angiogénesis es ya muy considerable en los dossecretos tipos de matrices, aproximadamente un 40%. Las células de médula hematopoyéticas o mesenquimales, los leucocitos aislados a partir de sangre de vena umbilical o de sangre periférica, las células madre, las células amnióticas, las células epiploicas, las células derivadas de tejidos adiposos, etc., todas estas células pueden participar en ciertas condiciones en la angiogénesis y por tanto ser interesantes para ser asociadas a otras poblaciones celulares. En los experimentos de Crisa L. *et al.*, las células endoteliales humanas de tipo HUVEC solo forman muy pocos vasos en matrices colagénicas (véase Crisa *et al.* (1999)¹¹³). De acuerdo con esta observación, en el experimento de los inventores, la cantidad de angiogénesis en matrices modificadas con el péptido RGD (T o TR) con o sin célula endotelial humana (HUVEC) era sensiblemente igual (6,7% +/- 2,5 frente a 7,9% +/- 3 ns) (figura 8). De forma muy interesante, la angiogénesis en las matrices colagénicas puede ser aumentada en presencia de progenitores para las células endoteliales aisladas a partir de sangre en circulación (es decir, progenitores CDR34+) hasta (22,3% +/- 5,5) pero solamente si las matrices fueron modificadas con el péptido RGD (figura 8). Por tanto, esto demuestra claramente el interés de utilizar los restos de adhesiones en las matrices colagénicas con células humanas.

Diferentes propuestas están en vías de desarrollo para aumentar la angiogénesis en entornos tridimensionales. Las preparaciones a partir de tejidos fetales pueden contener ya también células y la presencia del resto RGD podría favorecer la supervivencia y diferenciación de estas células. Recientemente los inventores han descrito la presencia en los tejidos fetales diferenciados de células madre que son capaces de incorporarse en la estructura vascular del hospedante para aumentar la angiogénesis local (véase S. Cherqui *et al.* (2006))¹¹¹. Estas células son muy dependientes para su supervivencia de factores secretados por las células "feeder" esencialmente de los fibroblastos (F). A las 3 semanas, la capacidad potencial angiogénica de estas células feeder "F" permanece baja si se compara con la de los progenitores para la célula endotelial "P" y la angiogénesis obtenida del mismo orden de magnitud que la obtenida en la matriz sin célula o en los músculos espinales circundantes (figura 9). No obstante, como se muestra en la figura 10, la presencia de una población celular acelera la angiogénesis inicial es entonces de 6% a los 7 días mientras que no es ni siquiera detectable en ausencia de células asociadas. Más tarde, la cantidad de angiogénesis esta aumentada en las matrices modificadas con el péptido RGD, pero solamente en presencia del progenitor para la célula endotelial para alcanzar un valor de plataforma de aproximadamente 14%, mientras que en ausencia de RGD o en presencia de células nutrientes ("feeder cell"), la angiogénesis permanece baja y estables (figura 10).

Aplicaciones

Por tanto, esta propuesta podría tener un interés doble, el primero sería favorecer y acelerar la angiogénesis inicial recurriendo a células que tienen una capacidad proangiogénica y la segunda sería asociar al propio tejido una población de células endoteliales que tenga la capacidad de diferenciarse y formar vasos en un entorno 3D modificado que lo permita. Todos estos son parámetros que van a limitar los fenómenos isquémicos iniciales posteriores a la implantación y aumentar la angiogénesis en zonas isquémicas o necrosadas.

Las matrices son implantadas en músculos espinales porque, como para el tejido de miocardio, se trata de un tejido muscular y, por otra parte, en ciertos casos, antes de ser implantado en contacto con el miocardio, el tejido celularizado puede ser implantado también en sitios ectópicos bien vascularizados, sirviendo el paciente receptor de hecho de biorreactor para desarrollar su propio tejido. Estos sitios podrían ser, por ejemplo, la cavidad peritoneal, particularmente el epiplón, un tejido muscular como el gran dorsal, por ejemplo, la cavidad pleural, tejido subcutáneo, etc. En estos sitios, se podrían acumular diferentes estructuras principales unas sobre las otras de forma que se podría obtener un tejido de grosor bien vascularizado¹¹⁴. En estos diferentes sitios, se podrían aplicar diferentes estímulos (químicos, biológicos, físicos, etc.). Estos estímulos podrían ser, entre otros, una estimulación eléctrica que ha mostrado su interés para mejorar la calidad de un tejido contráctil, o una tensión mecánica. Los diferentes estímulos podrían o no estar sincronizados con la frecuencia cardíaca del paciente. Un medio para aplicar la tensión de cizallamiento sería fijar la estructura principal a un soporte cuyo volumen puede variar, como un sistema hinchable como un balón o una boya que podría tener, por ejemplo, la forma de las cavidades ventriculares. El soporte podría ser de silicona, por ejemplo, con el fin de limitar la adhesión de la matriz a este soporte. Una parte de la estructura principal podría estar cubierta con tejidos o dispositivos destinados a limitar las adhesiones locales con el fin de facilitar las nuevas intervenciones iterativas. Después de varias semanas, la estructura principal vascularizada podría ser transferida seguidamente al pericardio para ser aplicada sobre el corazón, para sustituir una parte o la totalidad de la pared miocárdica, para tratar alteraciones del funcionamiento miocárdico, en forma de un injerto libre o injerto pediculado³⁰. En ciertos casos, por ejemplo, un colgajo epiploico o de músculo esquelético, podría ser utilizado un colgajo para recibir el parche contráctil o bien para transferir el parche al pericardio. La utilización del parche contráctil puede ser asociada también a la utilización de otros métodos de regeneración del miocardio, como la terapia celular. En esta invención se propone la utilización de "fibrinas modificadas" en las diferentes aplicaciones médicas y quirúrgicas en las que es clásicamente empleada la fibrina. Una de las aplicaciones es la ingeniería de tejidos, la terapia celular o la mejora de dispositivos médicos/quirúrgicos o de

soportes que contienen fibrina/fibrinógeno.

La utilización de soportes inyectables como, por ejemplo, soportes basados en colágeno (micro- o nanopartículas de colágeno asociadas o no a otros componentes para favorecer su polimerización en asociación con una población celular, modificados para secretar factores o actividad, por ejemplo, enzimática, destinados a provocar la polimerización del colágeno) o fibrina inyectable modificada o no con células de adhesión (un gel basado en fibrina o colágeno con una modificación del fibrinógeno o de la fibrina con restos de adhesiones) asociadas o no a células podría ser utilizada para facilitar la unión de los tejidos contráctiles al miocardio o, por ejemplo, con el fin de preparar o de ayudar a la preparación del sitio en el que se va a hacer la transferencia del parche contráctil, por ejemplo, prevascularizándolo. Las terapias celulares podrían mejorar los resultados obtenidos con la simple utilización del parche contráctil. Los soportes inyectables podrían ser inyectados en un tejido, en un soporte, en un dispositivo utilizado en un tratamiento cardiorrástico y vascular, en un vaso o sus combinaciones. Todos los diferentes tipos de células no están necesariamente presentes en el soporte al mismo tiempo. El soporte inyectable puede ser utilizado independientemente del parche.

En ciertas realizaciones, la estructura principal podría estar asociada a un dispositivo que estaría destinado a prevenir las remodelaciones o dilatación ventricular como redes, por ejemplo, o un dispositivo que estaría destinado a tratar trastornos miocárdicos. Estos dispositivos podrían rodear una parte o la totalidad del corazón. Este dispositivo, en ciertos casos, podría estar esencialmente compuesto por la matriz contráctil. La aplicación de una estructura principal externa podría estar asociada a la inyección de células en el miocardio. Estas células podrían ser inyectadas en la estructura principal 3D modificada con células de adhesión como el resto RGD.

Con el fin de favorecer la revascularización de estos soportes, podrían ser utilizadas quimocinas que favorecen la recolección de células madre como SDF1, SCF, TGF-alfa, FGF, etc. podrían utilizados también agentes destinados a movilizar las células madre del paciente con el fin de favorecer de revascularización del implante.

Actualmente se lleva a cabo un estudio multicéntrico internacional humano comparando la inyección simple intramiocárdica de células de médula hematopoyética en zonas interfaciales a esta misma inyección de células, pero esta vez asociada a una aplicación de matriz colagénica celularizada con células de médula. Esta matriz de momento no es modificada con péptidos de adhesión (véase Etude MAGNUM). Se ha mostrado recientemente el interés de utilizar esta matriz colagénica celularizada depositada sobre el miocardio, por ejemplo, mediante la simple inyección de células (véase JC Chachques, JG Trainini, J. Mouras, O. Schussler. Myocardial assistance by grafting a new bioartificial upgraded myocardium (MAGNUM trial): Preliminary results AATS (2006); JC. Chachques, JC. Traini, O. Schussler. Myocardial Assistance by Grafting a new bioartificial upgraded myocardium (MAGNUM trial): Clinical feasibility AHA (2006)). El desarrollo de matrices de colágeno modificadas como se propone en la presente invención debería mejorar incluso grandemente los resultado en un futuro próximo.

Esta invención se propone mejorar la terapia celular en el campo de la medicina y la cirugía torácica y cardiovascular utilizando soportes colagénicos modificados con moléculas de adhesión con la realización, para la aplicación principal, de un tejido cardíaco contráctil. Además de las aplicaciones cardiovasculares y torácicas y, de forma más general, este soporte podría ser utilizado para realización de tejido contráctil espontáneamente o bajo estimulación eléctrica con un interés para la realización de tejido muscular liso o esquelético con el fin de fabricar, por ejemplo, esfínteres, un músculo vesical, etc.

Entre las principales aplicaciones se encuentra la utilización de estos soportes para la ingeniería de tejidos con la fabricación de tejido de sustitución, reconstrucción, parches, regeneración de tejidos, aceleración de la cicatrización, prevención de la dehiscencia, desunión, hermeticidad al aire y/o líquidos, con la realización de tejidos, entre otros: miocardio y/o tejidos valvulares (incluidas la válvulas, el aparato subvalvular y la cámara de transporte), tejidos traqueobronquiales y pulmonares, tejidos vasculares, tejidos de reconstrucción parietal y pericárdica. Está incluida la utilización de este tipo de soporte para la terapia celular con posibilidad de que este soporte sea inyectado en un tejido, en una luz vascular o bronquial, en otro soporte o dispositivo médico o quirúrgico utilizado en cirugía torácica o cardiovascular. Existe la posibilidad de utilizar este soporte para realizar un marcapasos biológico asociando células que tienen una actividad rítmica intrínseca como cardiomiocitos atriales disociados (células nodales, incluidas las sinusales) de origen embrionario, fetal o adulto o cultivos transformados que tengan una actividad rítmica, implantadas en una matriz biodegradable pro-angiogénica y destinada a ser implantada en el corazón. La asociación de péptidos de adhesión mantendrá la célula en el mismo lugar, favorecerá su supervivencia, la interacción entre las células con una mejor sincronización entre ellas y una mejor integración con el tejido circundante.

Esto podría conducir a un método para la ingeniería de tejidos cardíacos utilizando una población celular que tenga o que puede desarrollar posibilidades contráctiles durante su diferenciación. Inseminación de las células en la estructura principal de la matriz de las células. Posibilidad de exponer la célula a uno de los agentes escogidos para favorecer la diferenciación de la célula o la etapa de exposición puede ser realizada antes o después de la etapa de implantación en la matriz o ambas cosas. La posibilidad de asociar otros tipos celulares como células pertenecientes a la línea endotelial. Como para las células contráctiles, el soporte permitirá su supervivencia y su diferenciación. La invención suministra un medio para realizar construcciones cardíacas en ausencia de un gel como Matrigel®

(Becton-Dickinson) que es extraído de un tumor y reduce la difusión de los nutrientes, obligando a realizar tejidos de menos grosor. Por otra parte, la diferenciación terminal de las células contráctiles no necesita obligatoriamente la utilización de una electroestimulación crónica, de biorreactores y de dosis elevadas de suero xenógeno muy inmunógeno. Es posible también realizar cultivos de células en soportes 2D que contienen indistintamente fibrina/fibrinógeno/colágeno o una asociación de los mismos y de los que al menos uno de estos constituyentes es modificado mediante la fijación de moléculas de adhesión. La adherencia de estas células a este soporte podría ser controlada. Los cultivos sobre soporte de fibrinas están actualmente en desarrollo¹¹⁵. Podrían ser superpuestas diferentes capas de células para obtener tejidos de grosor más considerable¹¹⁴. Las células endoteliales podrían ser asociadas con el fin de favorecer la angiogénesis. Estos soportes podrían ser aplicados sobre el corazón utilizando sistemas como membranas de colágeno para facilitar esta aplicación.

La construcción puede ser formada *in vitro* durante varias semanas y seguidamente ser directamente implantada sobre el miocardio como una inserción supuestamente contráctil o en el interior del miocardio destinada a sustituir, por ejemplo, una parte o la totalidad del tejido miocárdico. Alternativamente, la construcción podría ser implantada *in vivo* en posición ectópica para favorecer la diferencia de las células y su neovascularización. Estos emplazamientos podrían ser, por ejemplo, emplazamientos ectópicos bien vascularizados como la cavidad peritoneal y pleural, el epiplón, músculo esquelético electroestimulado o no, cavidad pleural, pericardio o pared. La geometría interna del miocardio podría ser suministrada envolviendo *in situ* el tejido alrededor de las estructuras, si es posible no adherentes y no resorbibles como una prótesis de silicona o cualquier otro polímero sintético. Estas estructuras podrían tener una geometría variable y podrían adoptar la forma de una parte de la cavidad ventricular. Este dispositivo podría ser hinchable. Las variaciones de volumen de este dispositivo podrían ser un medio para aplicar tensiones mecánicas al tejido miocárdico en vías de desarrollo. Podrían ser aplicados otros estímulos como un estímulo eléctrico crónico. Podrían estar superpuestas sucesivamente varias hojas de tejido para construir un tejido más grueso durante la primera intervención o durante intervenciones sucesivas. La construcción vascular puede ser aplicada secundariamente sobre el corazón en un injerto libre o un injerto pediculado, pero es posible también sustituir una parte o el grosor total del miocardio. La estructura principal celularizada puede ser fijada al corazón empleando, por ejemplo, geles de colágeno o de fibrina. Estas propuestas pueden emplear también una terapia celular asociada o no a la estructura principal 3D modificada o no mediante péptidos de adhesión. El parche ventricular puede ser una parte o estar asociado a un dispositivo de contención del corazón destinado a evitar la dilatación cardíaca, favorecer la remodelación, mejorar la contractilidad del miocardio, la regeneración o para tratar estados del miocardio. La asociación del dispositivo de contención del miocardio a un soporte destinado a ser celularizado lleva a cabo una asistencia cardíaca biológica. Es posible también concebir una red que rodee el corazón que podría ser celularizada. La utilización de un parche contráctil como prótesis aórtica o deposita sobre la aorta nativa, sincronizado o no con la frecuencia cardíaca, es otra forma de realizar una asistencia cardíaca biológica.

Podrían ser igualmente utilizadas matrices colagénicas para la terapia celular. Las células pueden estar asociadas a soportes funcionalizados con moléculas de adhesión y reticuladas *in vitro* o *in vivo*. En otros casos, las células pueden ser inyectadas. Pueden ser utilizadas diferentes formas de soportes como geles, hidrogeles formados a partir de nanopartículas de colágenos, microesferas de colágeno asociadas a nanopartículas orgánicas o no, colágeno asociado a nanopartículas orgánicas o no, etc. La invención se propone mejorar la biofuncionalidad de estructuras principales de fibrina sola o asociada a colágeno, por ejemplo, modificando el fibrinógeno, la fibrina y/o el colágeno mediante la fijación de moléculas de adhesión como se propone en la presente invención. La asociación del resto RGD durante la polimerización de adhesivo de fibrina ha sido propuesta para la inyección de células en el corazón, pero se trata de moléculas de adhesión no fijadas y, por tanto, la funcionalidad puede ser mejorada (patente de EE.UU. 20052761631). Las moléculas de adhesión pueden ser asociadas a fibrinógeno o a colágeno *in vitro*. La enzima asociada en el momento de inyección, generalmente trombina en presencia de calcio, induce la transformación del fibrinógeno en fibrina y la formación del soporte 3D. Esta estructura principal de fibrina/fibrinógeno/colágeno opcionalmente asociada a otros componentes podría ser utilizada para la ingeniería de tejidos, la terapia celular o para realizar diferentes dispositivos médicos y/o quirúrgicos, no solamente en el campo cardiovascular.

Entre los dispositivos quirúrgicos/médicos en el campo torácico y cardiovascular que serían ventajosamente mejorados se encuentra la realización de válvulas viables con endoprótesis o no construidas a partir de soporte que contiene colágeno o fibrina/fibrinógeno modificado y celularizado con células autólogas o no, soportes diferentes a los propuestos como las matrices sintéticas (patentes de EE.UU. 20060253192, 20060246584), anillos valvulares resolubles o anillos viables con posibilidad de remodelación, red de contención miocárdica que contiene colágeno o asociada a un soporte que contiene colágeno o asistencia biológica externa destinada a mejorar la contracción y/o regeneración y/o remodelación y/o contención del miocardio y/o para tratar estados miocárdicos o un miocardio patológico y/o para mantener un soporte celularizado, adhesivos biológicos, membranas de hemocompatibilidad, realización de bioprótesis de válvulas cardíacas poco trombógenas, válvulas tubulares, fabricación de prótesis, endoprótesis y endoprótesis vascular, sustituto vascular, por ejemplo, con soporte colagénico modificado para realizar injertos poco trombógenos (injertos vasculares, comprendidos los injertos coronarios), realización de injertos vasculares contráctiles espontáneamente o bajo estimulación eléctrica como injertos que podrían ser utilizados como asistencia cardíaca, endoprótesis coronarias y endosinusianos (endoprótesis eluidas con fármacos, endoprótesis resorbibles, endoprótesis celularizadas) (la asociación del RGD cíclico a un componente metálico de fármaco eluido

fue ya propuesta en la patente de EE.UU. 20050123582), modificación del contenido colagénico endobronquial, espiral o bypass también con la posibilidad de asociar células de interés, prótesis de sustitución traqueobronquial, prótesis y endoprótesis endotraqueal o endobronquial, o soporte para la liberación de agente bioactivo.

- 5 La biocompatibilidad de los soportes colagénicos en general, reconstituidos a partir de fibras de colágeno, se mejora considerablemente si, después de una reticulación mediante genipina, son parcialmente revestidos con proteoglicanos métodos clásicos ya utilizados durante la fijación de tejidos mediante genipina. En el caso de la fijación clásica de soportes colagénicos (tejidos, soportes reconstituidos o dispositivo que contiene colágeno) mediante glutaraldehído, la compatibilidad se mejora mediante una fijación posterior de proteoglicano mediante un reactivo de acoplamiento de las proteínas como carbodiimida soluble, seguido opcionalmente de una reducción mediante borohidruro de sodio o cianoborohidruro de sodio. El componente colagénico de estos soportes puede ser ventajosamente funcionalizados con moléculas de adhesiones.

15 Los soportes colagénicos modificados según la invención pueden encontrar además una aplicación importante para la terapia celular en el músculo, ingeniería de tejidos contráctiles espontáneamente o bajo estimulación (músculos lisos, esqueléticos o cardíacos), la terapia celular en general utilizando células con capacidad potencial contráctil que pueden ser opcionalmente modificadas genéticamente para liberar, por ejemplo, agentes bioactivos.

20 Existe la posibilidad de utilizar los soportes de fibrina/fibrinógeno con o sin colágeno, modificados o no, para: terapia celular, ingeniería de tejidos y para la realización de dispositivos médicos/quirúrgicos en general.

1. Yasuda, T. *et al.* Quantitative analysis of survival of transplanted smooth muscle cells with real-time polymerase chain reaction. *J Thorac Cardiovasc Surg* 129, 904-11 (2005).

25 2. Whittaker, P., Muller-Ehmsen, J., Dow, J.S., Kedes, L.H. & Kloner, R.A. Development of abnormal tissue architecture in transplanted neonatal rat myocytes. *Ann Thorac Surg* 75, 1450-6 (2003).

3. Mangi, A.A. *et al.* Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat Med* 9, 1195-201 (2003).

30 4. Leor, J., Amsalem, Y. & Cohen, S. Cells, scaffolds, and molecules for myocardial tissue engineering. *Pharmacol Ther* 105, 151-63 (2005).

5. Zimmermann, W.H., Melnychenko, I. & Eschenhagen, T. Engineered heart tissue for regeneration of diseased hearts. *Biomaterials* 25, 1639-47 (2004).

6. Eschenhagen, T. & Zimmermann, W.H. Engineering myocardial tissue. *Circ Res* 97, 1220-31 (2005).

7. Nugent, H.M. & Edelman, E.R. Tissue engineering therapy for cardiovascular disease. *Circ Res* 92, 1068-78 (2003).

8. Shachar, M. & Cohen, S. Cardiac tissue engineering, ex-vivo: design principles in biomaterials and bioreactors. *Heart Fail Rev* 8, 271-6 (2003).

45 9. Suuronen, E.J. *et al.* Tissue-engineered injectable collagen-based matrices for improved cell delivery and vascularization of ischemic tissue using CD133+ progenitors expanded from the peripheral blood. *Circulation* 114, 1138-44 (2006).

50 10. Qian, H., Yang, Y., Huang, J., Dou, K. & Yang, G. Cellular cardiomyoplasty by catheter-based infusion of stem cells in clinical settings. *Transpl Immunol* 16, 135-47 (2006).

11. Kumaran, V., Joseph, B., Bente, D. & Gupta, S. Integrin and extracellular matrix interactions regulate engraftment of transplanted hepatocytes in the rat liver. *Gastroenterology* 129, 1643-53 (2005).

55 12. MacDonald, R.A., Laurenzi, B.F., Viswanathan, G., Ajayan, P.M. & Stegemann, J.P. Collagen-carbon nanotube composite materials as scaffolds in tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 74, 489-96 (2005).

13. Griffith, L.G. & Swartz, M.A. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 211-24 (2006).

60 14. Vogel, V. & Sheetz, M. Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 265-75 (2006).

65 15. Badylak, S.F. Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Transpl Immunol* 12, 367-77 (2004).

16. Samarel, A.M. Costameres, focal adhesions, and cardiomyocyte mechanotransduction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289, H2291-301 (2005).
17. Kuppuswamy, D. Importance of integrin signaling in myocyte growth and survival. *Circ Res* 90, 1240-2 (2002).
18. Meredith, J. & Schwartz, M. Integrins, adhesion and apoptosis, 146-150 (1997).
19. Walker, J.L., Fournier, A.K. & Assoian, R.K. Regulation of growth factor signaling and cell cycle progression by cell adhesion and adhesion-dependent changes in cellular tension. *Cytokine Growth Factor Rev* 16, 395-405 (2005).
20. Chen, S.S., Fitzgerald, W., Zimmerberg, J., Kleinman, H.K. & Margolis, L. Cell-cell and cell-extracellular matrix interactions regulate embryonic stem cell differentiation. *Stem Cells* 25, 553-61 (2007).
21. Liu, W.F. & Chen, S.C. Engineering biomaterials to control cell function. *Materials Today* 8, 28-35 (2005).
22. Hersel, U., Dahmen, C. & Kessler, H. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials* 24, 4385-415 (2003).
23. Beer, J.H., Springer, K.T. & Collier, B.S. Immobilized Arg-Gly-Asp (RGD) peptides of varying lengths as structural probes of the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor. *Blood* 79, 117-28 (1992).
24. Craig, W.S., Cheng, S., Mullen, D.G., Blevitt, J. & Pierschbacher, M.D. Concept and progress in the development of RGD-containing peptide pharmaceuticals. *Biopolymers* 37, 157-75 (1995).
25. Katsumi, A., Orr, A.W., Tzima, E. & Schwartz, M.A. Integrins in mechanotransduction. *J Biol Chem* 279, 12001-4 (2004).
26. Reinhart-King, C.A., Dembo, M. & Hammer, D.A. The dynamics and mechanics of endothelial cell spreading. *Biophys J* 89, 676-89 (2005).
27. Simon, A. & Durrieu, M.C. Strategies and results of atomic force microscopy in the study of cellular adhesion. *Micron* 37, 1-13 (2006).
28. Engler, A.J. *et al.* Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness: pathological implications for soft or stiff microenvironments. *J Cell Biol* 166, 877-87 (2004).
29. Deroanne, C.F., Lapiere, C.M. & Nusgens, B.V. In vitro tubulogenesis of endothelial cells by relaxation of the coupling extracellular matrix-cytoskeleton. *Cardiovasc Res* 49, 647-58 (2001).
30. Leor, J. & Cohen, S. Myocardial tissue engineering: creating a muscle patch for a wounded heart. *Ann N Y Acad Sci* 1015, 312-9 (2004).
31. Davis, M.E. *et al.* Injectable self-assembling peptide nanofibers create intramyocardial microenvironments for endothelial cells. *Circulation* 111, 442-50 (2005).
32. Narmoneva, D.A., Vukmirovic, R., Davis, M.E., Kamm, R.D. & Lee, R.T. Endothelial cells promote cardiac myocyte survival and spatial reorganization: implications for cardiac regeneration. *Circulation* 110, 962-8 (2004).
33. Weadock, K.S., Miller, E.J., Keuffel, E.L. & Dunn, M.G. Effect of physical crosslinking methods on collagen-fiber durability in proteolytic solutions. *J Biomed Mater Res* 32, 221-6 (1996).
34. Cornwell, K.G., Lei, P., Andreadis, S.T. & Pins, G.D. Crosslinking of discrete self-assembled collagen threads: Effects on mechanical strength and cell-matrix interactions. *J Biomed Mater Res A* 80, 362-71 (2007).
35. Kannan, R.Y., Salacinski, H.J., Sales, K., Butler, P. & Seifalian, A.M. The roles of tissue engineering and vascularisation in the development of micro-vascular networks: a review. *Biomaterials* 26, 1857-75 (2005).
36. Ilan, N., Mahooti, S. & Madri, J.A. Distinct signal transduction pathways are utilized during the tube formation and survival phases of in vitro angiogenesis. *J Cell Sci* 111 (Pt 24), 3621-31 (1998).
37. Satake, S., Kuzuya, M., Ramos, M.A., Kanda, S. & Iguchi, A. Angiogenic stimuli are essential for survival of vascular endothelial cells in three-dimensional collagen lattice. *Biochem Biophys Res Commun* 244, 642-6 (1998).
38. Ranta, V., Mikkola, T., Ylikorkala, O., Viinikka, L. & Orpana, A. Reduced viability of human vascular endothelial cells cultured on Matrigel. *J Cell Physiol* 176, 92-8 (1998).

39. Goto, F., Goto, K., Weindel, K. & Folkman, J. Synergistic effects of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and cord formation of bovine capillary endothelial cells within collagen gels [see comments]. *Laboratory Investigation* 69, 508-17 (1993).
- 5 40. Radisic, M. *et al.* Functional assembly of engineered myocardium by electrical stimulation of cardiac myocytes cultured on scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 18129-34 (2004).
41. Radisic, M. *et al.* Medium perfusion enables engineering of compact and contractile cardiac tissue. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286, H507-16 (2004).
- 10 42. Souren, J.E., Peters, R.C. & Van Wijk, R. Collagen gels populated with rat neonatal heart cells can be used for optical recording of rhythmic contractions which also show ECG-like potentials. *Experientia* 50, 712-6 (1994).
43. Souren, J.E., Schneijdenberg, C., Verkleij, A.J. & Van Wijk, R. Factors controlling the rhythmic contraction of collagen gels by neonatal heart cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 28A, 199-204 (1992).
- 15 44. Zimmermann, W.H. *et al.* Three-dimensional engineered heart tissue from neonatal rat cardiac myocytes. *Biotechnol Bioeng* 68, 106-14 (2000).
- 20 45. Zimmermann, W.H. *et al.* Engineered heart tissue grafts improve systolic and diastolic function in infarcted rat hearts. *Nat Med* 12, 452-8 (2006).
46. Eschenhagen, T., Didie, M., Heubach, J., Ravens, U. & Zimmermann, W.H. Cardiac tissue engineering. *Transpl Immunol* 9, 315-21 (2002).
- 25 47. Zimmermann, W.H. *et al.* Cardiac grafting of engineered heart tissue in syngenic rats. *Circulation* 106, 1151-7 (2002).
48. von Wnuck Lipinski, K. *et al.* Integrin-mediated transcriptional activation of inhibitor of apoptosis proteins protects smooth muscle cells against apoptosis induced by degraded collagen. *Circ Res* 98, 1490-7 (2006).
- 30 49. Meinel, L. *et al.* Engineering cartilage-like tissue using human mesenchymal stem cells and silk protein scaffolds. *Biotechnol Bioeng* 88, 379-91 (2004).
- 35 50. Coyle, C.H., Mendralla, S., Lanasa, S. & Kader, K.N. Endothelial Cell Seeding onto Various Biomaterials Causes Superoxide-induced Cell Death. *J Biomater Appl* (2006).
51. Grzesiak, J.J., Pierschbacher, M.D., Amodeo, M.F., Malaney, T.I. & Glass, J.R. Enhancement of cell interactions with collagen/glycosaminoglycan matrices by RGD derivatization. *Biomaterials* 18, 1625-32 (1997).
- 40 52. Dagalakis, N., Flink, J., Stasikelis, P., Burke, J.F. & Yannas, I.V. Design of an artificial skin. Part III. Control of pore structure. *J Biomed Mater Res* 14, 511-28 (1980).
53. Yannas, I.V., Lee, E., Orgill, D.P., Skrabut, E.M. & Murphy, G.F. Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 933-7 (1989).
- 45 54. Suuronen, E.J. *et al.* Innervated human corneal equivalents as in vitro models for nerve-target cell interactions. *Faseb J* 18, 170-2 (2004).
- 50 55. Kofidis, T. *et al.* Clinically established hemostatic scaffold (tissue fleece) as biomatrix in tissue- and organ-engineering research. *Tissue Eng* 9, 517-23 (2003).
56. Park, H., Radisic, M., Lim, J.O., Chang, B.H. & Vunjak-Novakovic, G. A novel composite scaffold for cardiac tissue engineering. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 41, 188-96 (2005).
- 55 57. Chen, R.N., Ho, H.O. & Sheu, M.T. Characterization of collagen matrices crosslinked using microbial transglutaminase. *Biomaterials* 26, 4229-35 (2005).
58. Goissis, G. *et al.* Biocompatibility studies of anionic collagen membranes with different degree of glutaraldehyde cross-linking. *Biomaterials* 20, 27-34 (1999).
- 60 59. Park, S.N., Park, J.C., Kim, H.O., Song, M.J. & Suh, H. Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide cross-linking. *Biomaterials* 23, 1205-12 (2002).
- 65 60. Zandonella, C. Tissue engineering: The beat goes on. *Nature* 421, 884-6 (2003).

61. Jockenhoevel, S. *et al.* Fibrin gel -- advantages of a new scaffold in cardiovascular tissue engineering. *Eur J Cardiothorac Surg* 19, 424-30 (2001).
- 5 62. Christman, K.L., Fok, H.H., Sievers, R.E., Fang, Q. & Lee, R.J. Fibrin glue alone and skeletal myoblasts in a fibrin scaffold preserve cardiac function after myocardial infarction. *Tissue Eng* 10, 403-9 (2004).
63. Christman, K.L. *et al.* Injectable fibrin scaffold improves cell transplant survival, reduces infarct expansion, and induces neovasculature formation in ischemic myocardium. *J Am Coll Cardiol* 44, 654-60 (2004).
- 10 64. Mol, A. *et al.* Fibrin as a cell carrier in cardiovascular tissue engineering applications. *Biomaterials* 26, 3113-21 (2005).
65. Rowe, S.L., Lee, S. & Stegemann, J.P. Influence of thrombin concentration on the mechanical and morphological properties of cell-seeded fibrin hydrogels. *Acta Biomater* 3, 59-67 (2007).
- 15 66. Liu, W. *et al.* Fibrin fibers have extraordinary extensibility and elasticity. *Science* 313, 634 (2006).
67. Boublik, J. *et al.* Mechanical properties and remodeling of hybrid cardiac constructs made from heart cells, fibrin, and biodegradable, elastomeric knitted fabric. *Tissue Eng* 11, 1122-32 (2005).
- 20 68. Beier, J.P. *et al.* Tissue engineering of injectable muscle: three-dimensional myoblast-fibrin injection in the syngeneic rat animal model. *Plast Reconstr Surg* 118, 1113-21; discussion 1122-4 (2006).
- 25 69. Williams, C., Johnson, S.L., Robinson, P.S. & Tranquillo, R.T. Cell sourcing and culture conditions for fibrin-based valve constructs. *Tissue Eng* 12, 1489-502 (2006).
70. McKenna, C.J. *et al.* Fibrin-film stenting in a porcine coronary injury model: efficacy and safety compared with uncoated stents. *J Am Coll Cardiol* 31, 1434-8 (1998).
- 30 71. Gutierrez San Roman, C. *et al.* Long-term assessment of the treatment of recurrent tracheoesophageal fistula with fibrin glue associated with diathermy. *J Pediatr Surg* 41, 1870-3 (2006).
72. Schense, J.C., Bloch, J., Aebischer, P. & Hubbell, J.A. Enzymatic incorporation of bioactive peptides into fibrin matrices enhances neurite extension. *Nat Biotechnol* 18, 415-9 (2000).
- 35 73. Hall, H., Baechi, T. & Hubbell, J.A. Molecular properties of fibrin-based matrices for promotion of angiogenesis in vitro. *Microvasc Res* 62, 315-26 (2001).
- 40 74. Korff, T. & Augustin, H.G. Tensional forces in fibrillar extracellular matrices control directional capillary sprouting. *J Cell Sci* 112 (Pt 19), 3249-58 (1999).
75. Eyrich, D. *et al.* Long-term stable fibrin gels for cartilage engineering. *Biomaterials* 28, 55-65 (2007).
76. Cummings, C.L., Gawlitta, D., Nerem, R.M. & Stegemann, J.P. Properties of engineered vascular constructs made from collagen, fibrin, and collagen-fibrin mixtures. *Biomaterials* 25, 3699-706 (2004).
- 45 77. Rowe, S.L. & Stegemann, J.P. Interpenetrating collagen-fibrin composite matrices with varying protein contents and ratios. *Biomacromolecules* 7, 2942-8 (2006).
- 50 78. Sarin, V., Gaffin, R.D., Meininger, G.A. & Muthuchamy, M. Arginine-glycine-aspartic acid (RGD)-containing peptides inhibit the force production of mouse papillary muscle bundles via alpha 5 beta 1 integrin. *J Physiol* 564, 603-17 (2005).
79. Balasubramanian, S. & Kuppaswamy, D. RGD-containing peptides activate S6K1 through beta3 integrin in adult cardiac muscle cells. *J Biol Chem* 278, 42214-24 (2003).
- 55 80. Boateng, S.Y. *et al.* RGD and YIGSR synthetic peptides facilitate cellular adhesion identical to that of laminin and fibronectin but alter the physiology of neonatal cardiac myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 288, C30-8 (2005).
- 60 81. Blindt, R. *et al.* A novel drug-eluting stent coated with an integrin-binding cyclic Arg-Gly-Asp peptide inhibits neointimal hyperplasia by recruiting endothelial progenitor cells. *J Am Coll Cardiol* 47, 1786-95 (2006).
82. Myles, J.L., Burgess, B.T. & Dickinson, R.B. Modification of the adhesive properties of collagen by covalent grafting with RGD peptides. *J Biomater Sci Polym Ed* 11, 69-86 (2000).
- 65 83. Lindberg, K. & Badyal, S.F. Porcine small intestinal submucosa (SIS): a bioscaffold supporting in vitro primary

human epidermal cell differentiation and synthesis of basement membrane proteins. *Bums* 27, 254-66 (2001).

84. Badylak, S.F., Record, R., Lindberg, K., Hodde, J. & Park, K. Small intestinal submucosa: a substrate for in vitro cell growth. *J Biomater Sci Polym Ed* 9, 863-78 (1998).

85. Pierschbacher, M.D. & Ruoslahti, E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* 309, 30-3 (1984).

86. Pfaff, M., McLane, M.A., Beviglia, L., Niewiarowski, S. & Timpl, R. Comparison of disintegrins with limited variation in the RGD loop in their binding to purified integrins alpha IIb beta 3, alpha V beta 3 and alpha 5 beta 1 and in cell adhesion inhibition. *Cell Adhes Commun* 2, 491-501 (1994).

87. Iwamoto, Y. *et al.* YIGSR, a synthetic laminin pentapeptide, inhibits experimental metastasis formation. *Science* 238, 1132-4 (1987).

88. Tashiro, K. *et al.* A synthetic peptide containing the IKVAV sequence from the A chain of laminin mediates cell attachment, migration, and neurite outgrowth. *J Biol Chem* 264, 16174-82 (1989).

89. Liesi, P., Narvanen, A., Soos, J., Sariola, H. & Snounou, G. Identification of a neurite outgrowth-promoting domain of laminin using synthetic peptides. *FEBS Lett* 244, 141-8 (1989).

90. Massia, S.P. & Hubbell, J.A. Vascular endothelial cell adhesion and spreading promoted by the peptide REDV of the IIICS region of plasma fibronectin is mediated by integrin alpha 4 beta 1. *J Biol Chem* 267, 14019-26 (1992).

91. Altroff, H. *et al.* The eighth FIII domain of human fibronectin promotes integrin alpha5beta1 binding via stabilization of the ninth FIII domain. *J Biol Chem* 276, 38885-92 (2001).

92. Wong, J.Y., Weng, Z., Moll, S., Kim, S. & Brown, C.T. Identification and validation of a novel cell-recognition site (KNEED) on the 8th type III domain of fibronectin. *Biomaterials* 23, 3865-70 (2002).

93. Dee, K.C., Andersen, T.T. & Bizios, R. Design and function of novel osteoblast-adhesive peptides for chemical modification of biomaterials. *J Biomed Mater Res* 40, 371-7 (1998).

94. Rezaia, A. & Healy, K.E. Biomimetic peptide surfaces that regulate adhesion, spreading, cytoskeletal organization, and mineralization of the matrix deposited by osteoblast-like cells. *Biotechnol Prog* 15, 19-32 (1999).

95. Rezaia, A. & Healy, K.E. Integrin subunits responsible for adhesion of human osteoblast-like cells to biomimetic peptide surfaces. *J Orthop Res* 17, 615-23 (1999).

96. Mann, B.K. & West, J.L. Cell adhesion peptides alter smooth muscle cell adhesion, proliferation, migration, and matrix protein synthesis on modified surfaces and in polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res* 60, 86-93 (2002).

97. Emsley, J., Knight, C.G., Farndale, R.W., Barnes, M.J. & Liddington, R.C., Structural basis of collagen recognition by integrin alpha2beta1. *Cell* 101, 47-56 (2000).

98. Lee, W.K. *et al.* Improved calcification resistance and biocompatibility of tissue patch grafted with sulfonated PEO or heparin after glutaraldehyde fixation. *J Biomed Mater Res* 58, 27-35 (2001).

99. Chang, Y., Liang, H.C., Wei, H.J., Chu, C.P. & Sung, H.W. Tissue regeneration patterns in acellular bovine pericardia implanted in a canine model as a vascular patch. *J Biomed Mater Res A* 69, 323-33 (2004).

100. Chang, Y., Tsai, C.C., Liang, H.C. & Sung, H.W. In vivo evaluation of cellular and acellular bovine pericardia fixed with a naturally occurring crosslinking agent (genipin). *Biomaterials* 23, 2447-57 (2002).

101. Levenberg, S. *et al.* Engineering vascularized skeletal muscle tissue. *Nat Biotechnol* 23, 879-84 (2005).

102. Radisic, M. *et al.* High-density seeding of myocyte cells for cardiac tissue engineering. *Biotechnol Bioeng* 82, 403-14 (2003).

103. Coirault, C., Chemla, D., Suard, I., Pourny, J.C. & Lecarpentier, Y. Sarcomere relaxation in hamster diaphragm muscle. *J Appl Physiol* 81, 858-65 (1996).

104. Lecarpentier, Y. *et al.* Mechanics, energetics, and crossbridge kinetics of rabbit diaphragm during congestive heart failure. *Faseb J* 12, 981-9 (1998).

105. Lecarpentier, Y. *et al.* Real-time kinetics of sarcomere relaxation by laser diffraction. *Circ Res* 56, 331-9 (1985).

106. Black, A.F., Berthod, F., L'heureux, N., Germain, L. & Auger, F.A. In vitro reconstruction of a human capillary-like network in a tissue-engineered skin equivalent. *Faseb Journal* 12, 1331-40 (1998).
- 5 107. Baatout, S. Endothelial differentiation using Matrigel (review). *Anticancer Research* 17, 451-5 (1997).
108. Montesano, R., Pepper, M.S. & Orci, L. Paracrine induction of angiogenesis in vitro by Swiss 3T3 fibroblasts. *Journal of Cell Science* 105 (Pt 4), 1013-24 (1993).
- 10 109. De Coppi, P. *et al.* Angiogenic gene-modified muscle cells for enhancement of tissue formation. *Tissue Eng* 11, 1034-44 (2005).
110. Arbiser, J.L. *et al.* Oncogenic H-ras stimulates tumor angiogenesis by two distinct pathways. *proceedings of the national academy of sciences of the united states of america* 94, 861-6 (1997).
- 15 111. Cherqui, S. *et al.* Isolation and angiogenesis by endothelial progenitors in the fetal liver. *Stem Cells* 24, 44-54 (2006).
112. Hildbrand, P. *et al.* The role of angiopoietins in the development of endothelial cells from cord blood CD34+ progenitors. *Blood* 104, 2010-9 (2004).
- 20 113. Crisa, L. *et al.* Human cord blood progenitors sustain thymic T-cell development and a novel form of angiogenesis. *Blood* 94, 3928-40 (1999).
- 25 114. Shimizu, T. *et al.* Polysurgery of cell sheet grafts overcomes diffusion limits to produce thick, vascularized myocardial tissues. *Faseb J* 20, 708-10 (2006).
115. Furuta, A. *et al.* Pulsatile cardiac tissue grafts using a novel three-dimensional cell sheet manipulation technique functionally integrates with the host heart, in vivo. *Circ Res* 98, 705-12 (2006).
- 30

REIVINDICACIONES

1. Soporte tridimensional sólido para la colonización, la supervivencia y la diferenciación terminal de células con capacidad potencial contráctil y que tienen una actividad contráctil espontánea u obtenida por estimulación, caracterizado porque dicho soporte tridimensional está constituido por una esponja de colágeno en la cual:
 - a. el colágeno está reticulado,
 - b. el colágeno está en parte o totalmente modificado mediante la fijación covalente de moléculas de adhesión; y
 - c. el colágeno está exento de cualquier extracto tumoral;estando destinado dicho soporte a la terapia celular o a la ingeniería de tejidos en el campo de la medicina/cirugía torácica y cardiovascular.
2. Soporte colagénico tridimensional según la reivindicación 1, caracterizado porque las moléculas de adhesión comprenden el resto RGD.
3. Soporte colagénico tridimensional según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque el colágeno es purificado a partir de un tejido colagénico.
4. Soporte colagénico tridimensional según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque contiene o porque está asociado a una o varias moléculas o agentes bioactivos.
5. Soporte colagénico tridimensional según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque contiene al menos una población celular.
6. Soporte colagénico tridimensional según la reivindicación 5, caracterizado porque las células de dicha al menos una población celular son células con capacidad potencial contráctil, rítmica o angiogénica.
7. Soporte colagénico tridimensional según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque las moléculas de adhesión y/o las moléculas o agentes bioactivos están unidos por medio de radicales separadores y la naturaleza hidrófila, la flexibilidad y la longitud de los radicales separadores que unen las moléculas de adhesión y/o las moléculas o agentes bioactivos se escogen para optimizar las disponibilidades espaciales y facilitar la presentación y la interacción con las células de interés.
8. Soporte colagénico tridimensional según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la fijación covalente de las moléculas de adhesión utiliza un reactivo de acoplamiento heterobifuncional, para unir de forma covalente y unidireccional los grupos aminos primarios de las moléculas de adhesión a los grupos aminos primarios presentes en el soporte tridimensional.
9. Soporte colagénico tridimensional según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el colágeno es reticulado mediante un tratamiento físico escogido entre irradiación UV, irradiación mediante haces ionizantes o deshidratación y tratamiento mediante calor (reticulación deshidrotérmica, DHT).
10. Soporte colagénico tridimensional según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque es reticulado mediante diferentes procedimientos escogidos entre reticulación por glutaraldehído, un tratamiento mediante proteoglicanos y un tratamiento mediante un reactivo reductor de bases Schiff o su asociación.
11. Soporte colagénico tridimensional según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, asociado o no a proteoglicanos, caracterizado porque es reticulado mediante la acción de genipina.
12. Procedimiento de fabricación en el campo de la medicina/cirugía de un soporte colagénico tridimensional destinado a la terapia celular y/o a la ingeniería de tejidos contráctiles, caracterizado porque comprende las etapas siguientes:
 - a) una parte o la totalidad del contenido del soporte está formado por colágeno opcionalmente reticulado;
 - b) el contenido del soporte ha sido en parte o totalmente modificado mediante la fijación covalente de moléculas de adhesión;
 - c) el soporte ha sido también reticulado mediante glutaraldehído y un reactivo reductor de bases de Schiff o mediante genipina.
13. Procedimiento según la reivindicación 12, caracterizado porque comprende una etapa complementaria d) en la que el soporte ha sido tratado o no con proteoglicanos.

14. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 12 o 13, que recurre a un agente de acoplamiento heterobifuncional como sulfo-LC-SPDP para unir de forma covalente y unidireccional los grupos aminos primarios de las moléculas de adhesión y/o las moléculas bioactivas a grupos aminos primarios presentes en el soporte tridimensional.
- 5
15. Utilización de un soporte colagénico tridimensional según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, u obtenido mediante el procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en la realización de diferentes dispositivos en el campo de la medicina/cirugía cardiotorácica y vascular, como un parche de tejidos, un músculo papilar para tratar necrosis de pilares después de infarto, una prótesis vascular, un dispositivo destinado a 10 tratar estados del miocardio que asocia a) un sistema que permite controlar la remodelación o limitar la distensión ventricular por contención, b) un sistema que mejora la contractilidad del miocardio, un dispositivo contráctil para la liberación del principio activo, un adhesivo biológico, un soporte para la terapia celular y la ingeniería de tejidos en el campo torácico y cardiovascular.

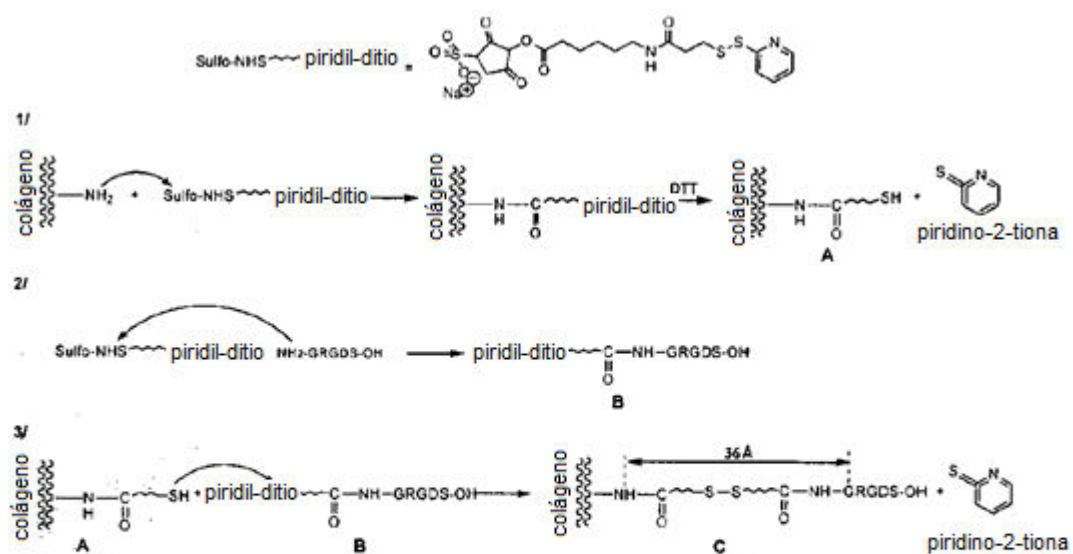


Figura 1

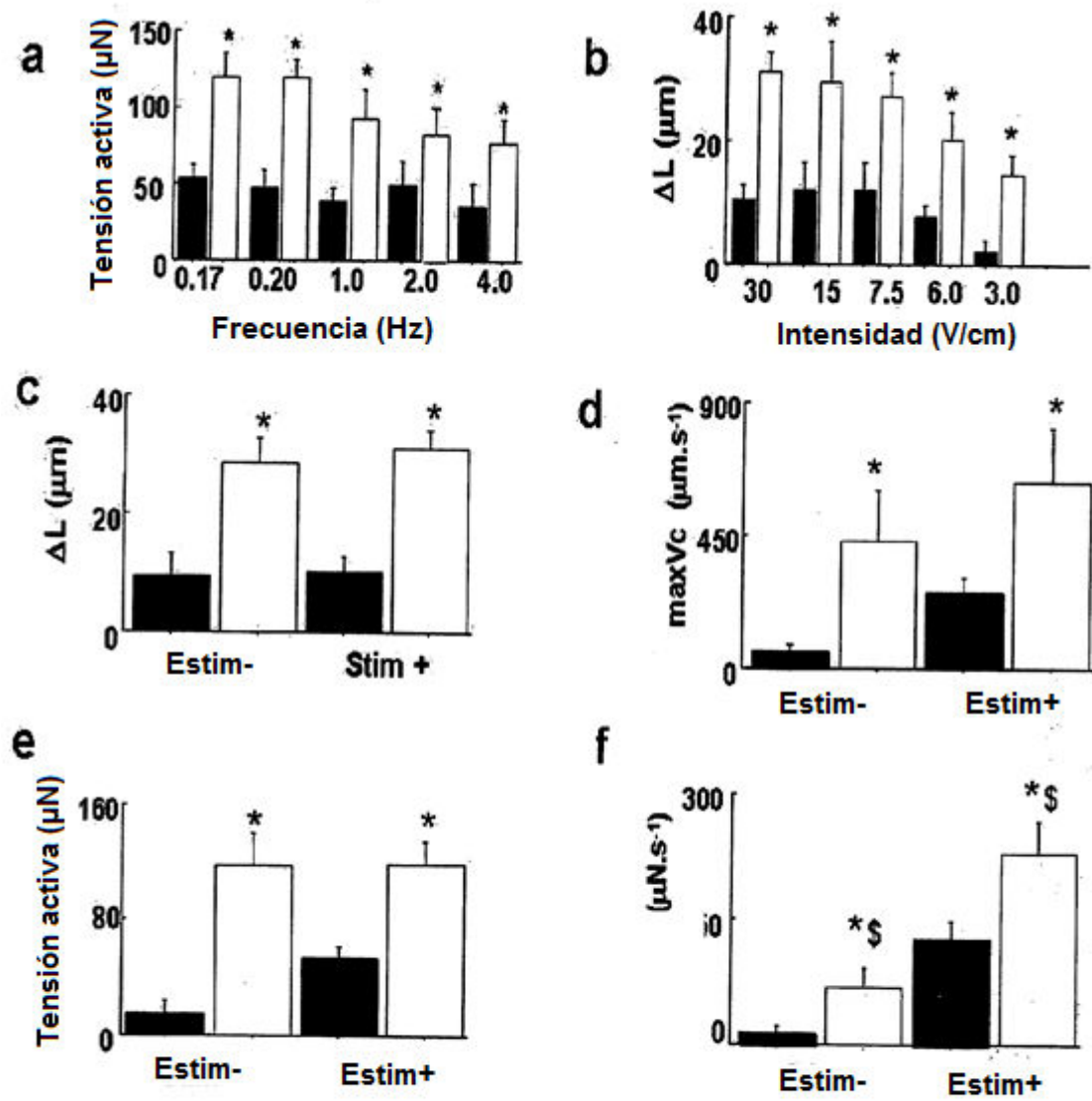


Figura 2

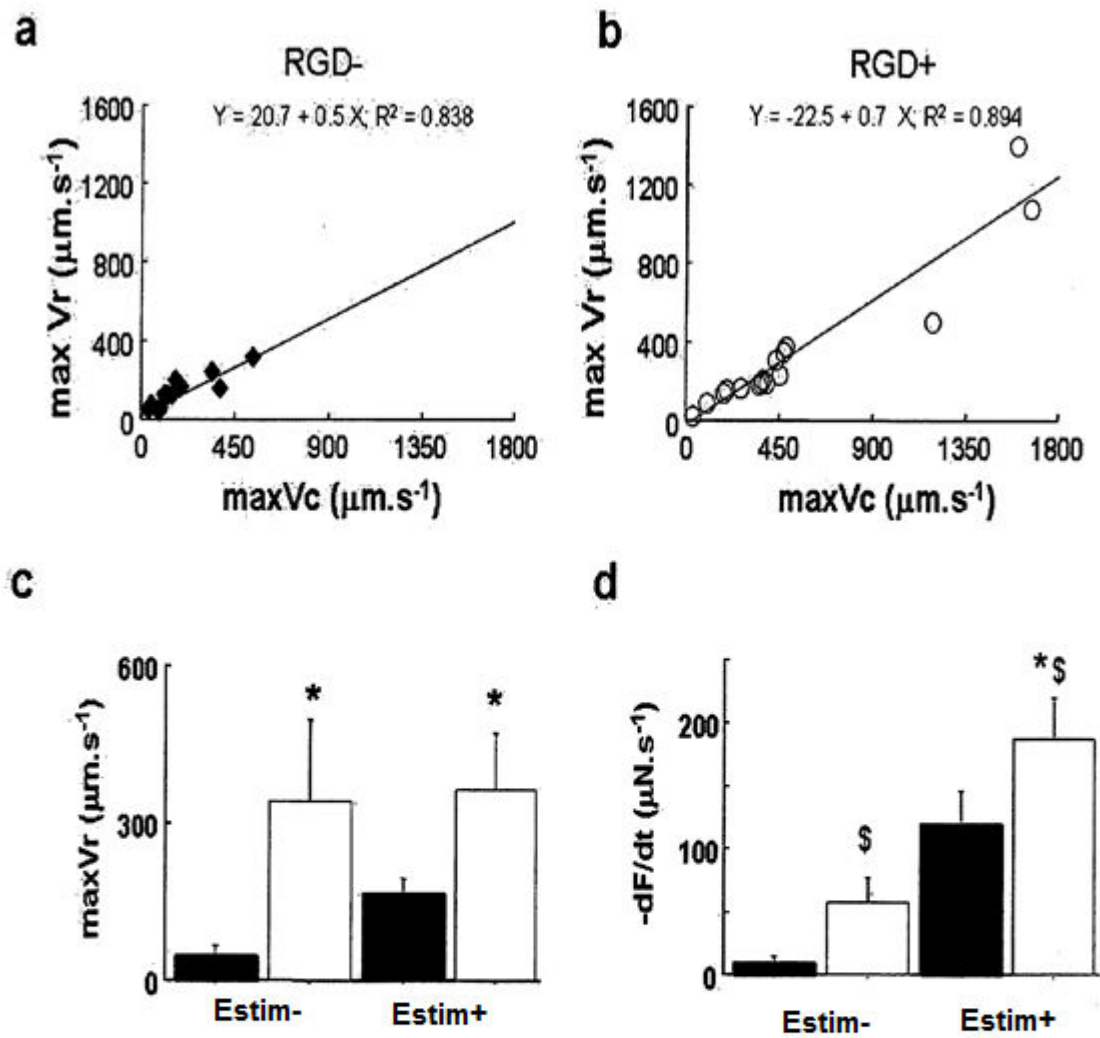
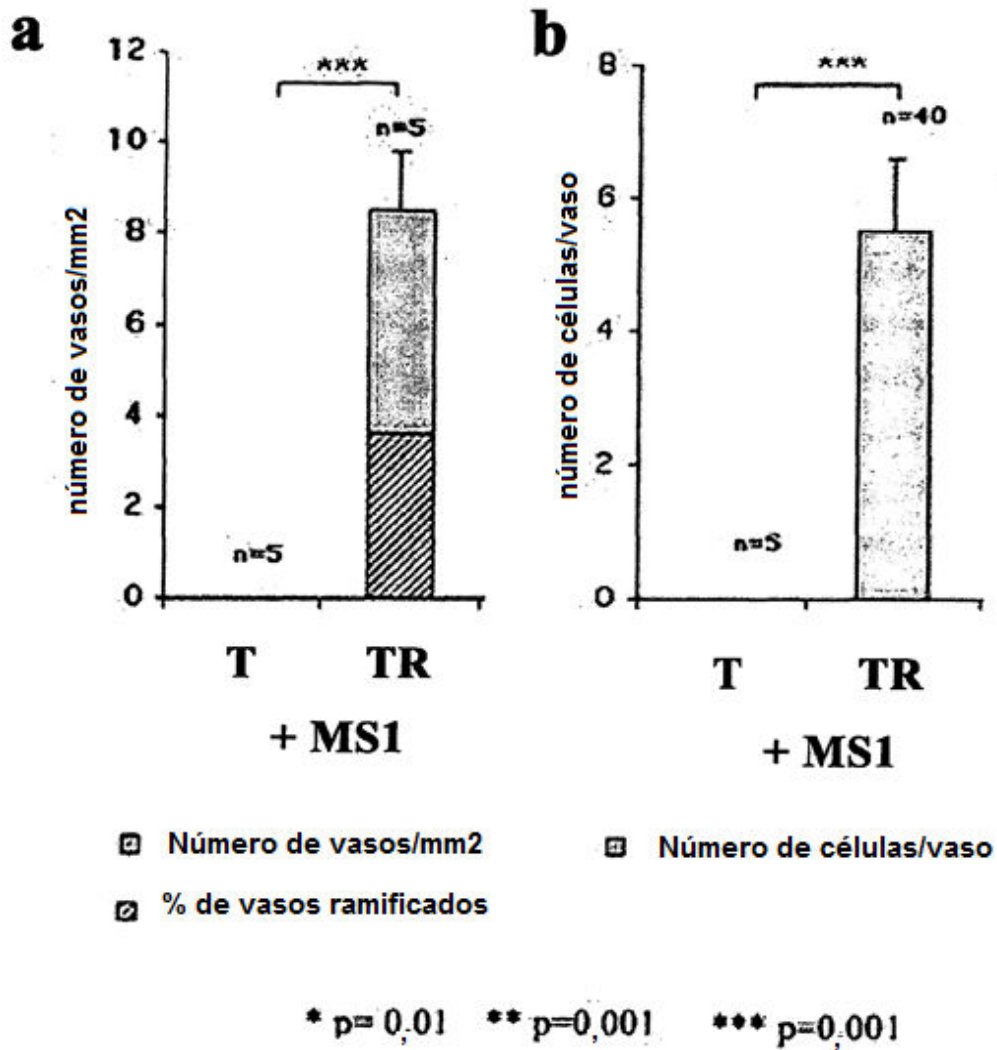
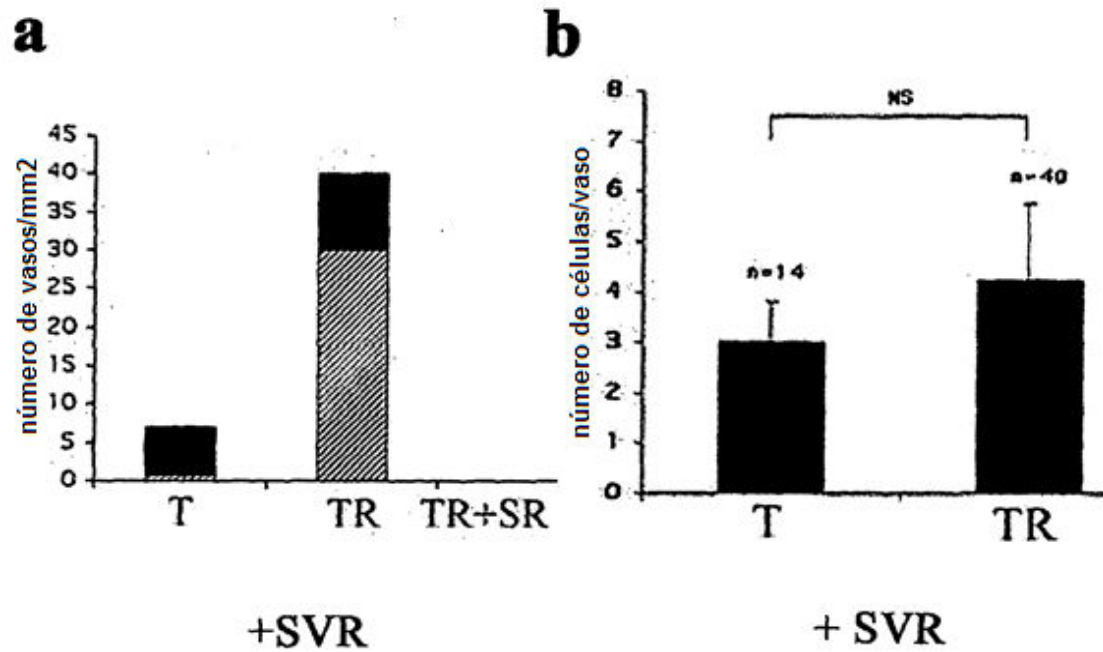


Figura 3



T: matriz colagénica
 TR: matriz colagénica funcionalizada con péptidos "RGD"

Figura 4



■ Número de vasos/mm²

■ Número de células/vaso

■ % de vasos ramificados

* $p=0.01$ ** $p=0.001$ *** $p=0.001$

T: matriz colagénica

TR: matriz colagénica funcionalizada con péptidos "RGD"

TR+SVR: matriz TR y adición de RGD no fijado en el medio

Figura 5

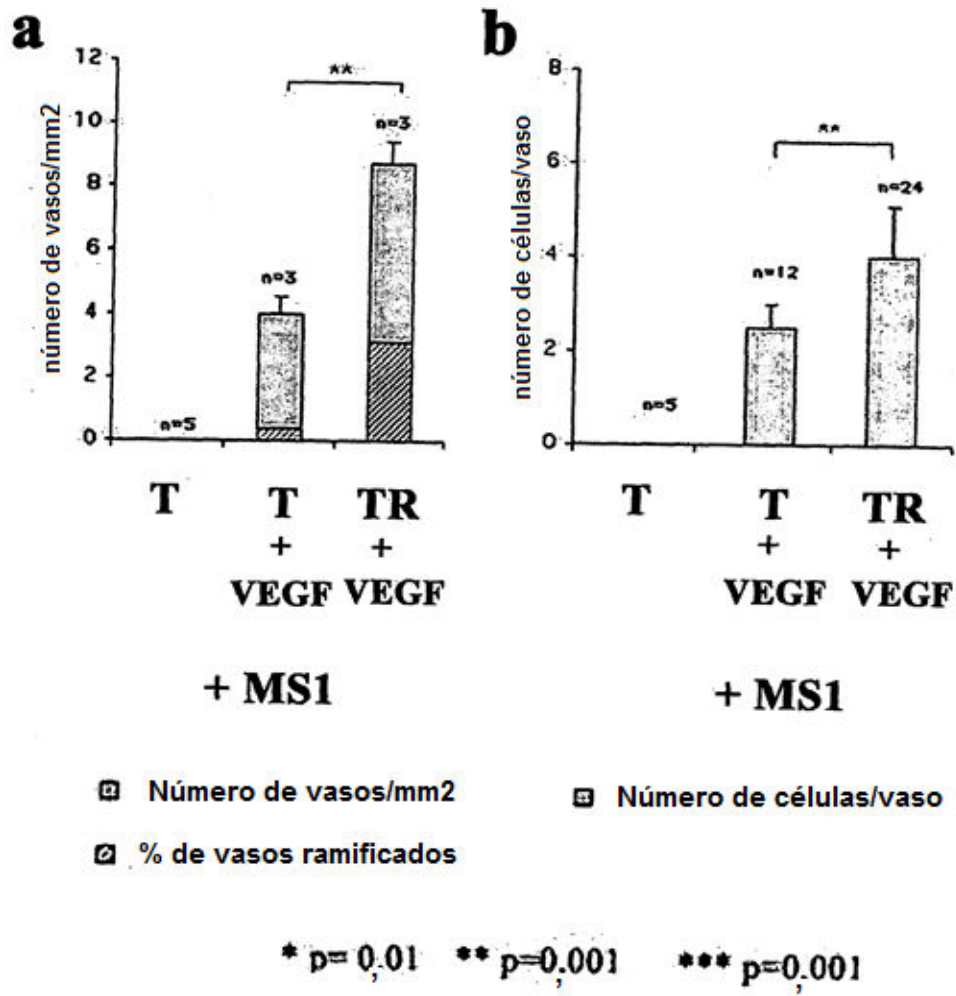


Figura 6

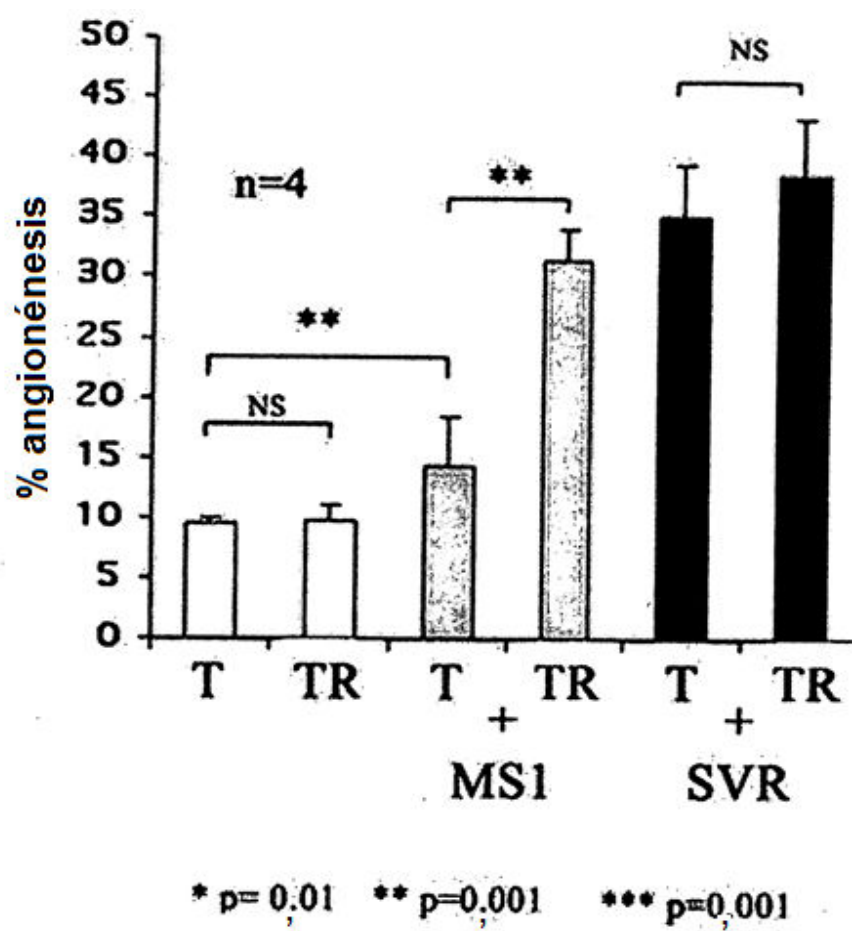


Figura 7

	T	TR	p
Angiogenesis de base (%)	6,2 +/- 2,2	6,7 +/- 2,5	ns
HUVEC	7,0 +/- 3,2	7,9 +/- 3,0	ns
Progenitor (CD34+)	7,5 +/- 2,7	22,3 +/- 5,5	p<0.05

Figura 8

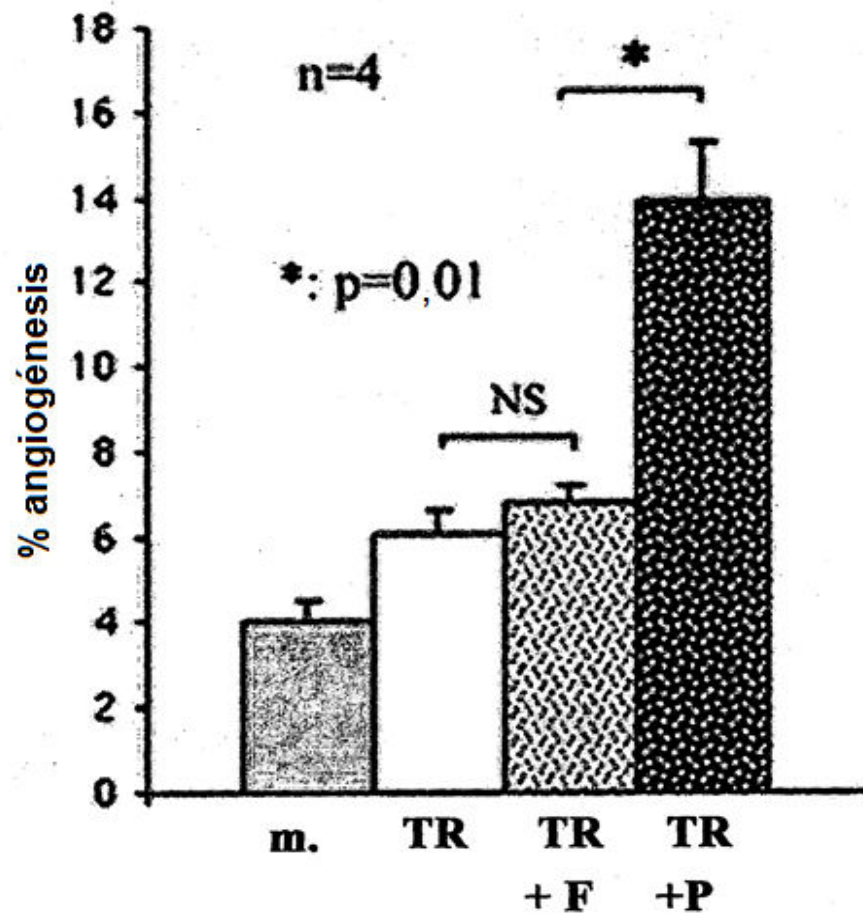


Figura 9

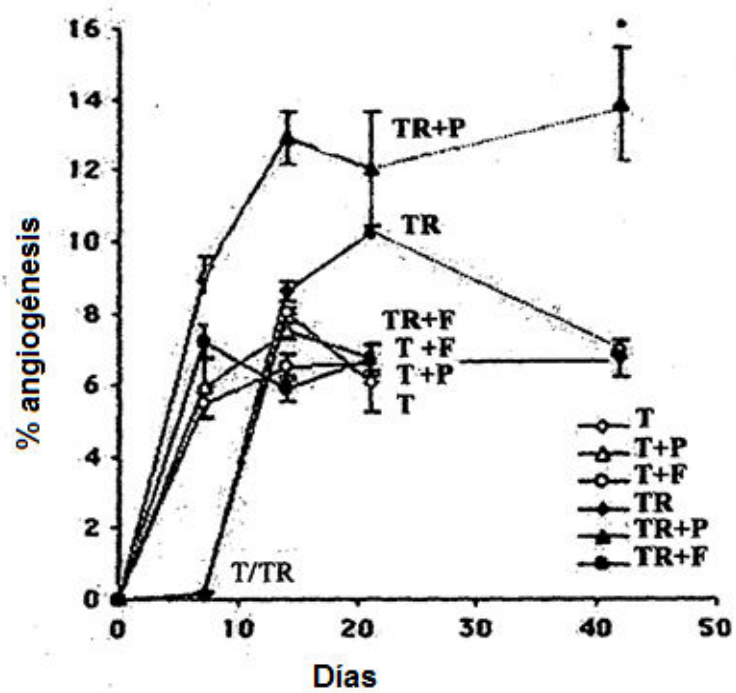


Figura 10