

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 724 587**

51 Int. Cl.:

**A61L 27/34** (2006.01)

**A61F 2/82** (2013.01)

**A61F 2/04** (2013.01)

**A61F 2/06** (2013.01)

**B29L 23/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.01.2012 E 15196598 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2019 EP 3011936**

54 Título: **Constructos generados por ingeniería de tejidos**

30 Prioridad:

**06.01.2011 US 201161430381 P**

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

**12.09.2019**

73 Titular/es:

**HUMACYTE, INC. (100.0%)  
2525 E NC Highway 54  
Durham, NC 27713, US**

72 Inventor/es:

**DAHL, SHANNON L.M.;  
NIKLASON, LAURA E.;  
BLUM, JULIANA;  
STRADER, JUSTIN T.;  
TENTE, WILLIAM E.;  
PRICHARD, HEATHER L. y  
LUNDQUIST, JOSEPH J.**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 724 587 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

Constructos generados por ingeniería de tejidos

## 5 Antecedentes de la invención

10 Existe una necesidad considerable de injertos vasculares cuando la propia vasculatura del paciente no está disponible debido a una extracción previa o es inadecuada como consecuencia de una enfermedad. Los casos en que podría necesitarse un injerto vascular incluyen la enfermedad arterial periférica, la enfermedad de la arteria coronaria y el acceso a la hemodiálisis en pacientes con enfermedad renal en etapa terminal. Hasta la fecha, el conducto vascular más exitoso para la cirugía vascular coronaria o periférica es el propio vaso sanguíneo del paciente, que se obtiene de otras partes del cuerpo, a menudo de la vena safena mayor en la pierna. Para los pacientes que requieren hemodiálisis, el acceso ideal es una fístula, o una conexión entre la propia arteria y vena del paciente.

15 Cuando no se dispone de vasos autólogos, se usan a menudo los injertos de politetrafluoroetileno (PTFE) sintético para aplicaciones de gran diámetro ( $\geq 6$  mm), tales como el acceso arteriovenoso para hemodiálisis (Sistema de datos renales de los EE.UU., "Informe anual de datos de USRDS 2009: Atlas de Enfermedad Renal Crónica y Enfermedad Renal en Etapa Terminal en los Estados Unidos" (Instituto Nacional de Salud, Instituto Nacional de Diabetes y Enfermedades Digestivas y Renales, 2009) o la derivación arterial periférica por encima de la rodilla. Sin embargo, los injertos de PTFE arteriovenoso para hemodiálisis tienen una permeabilidad mediana deficiente de solo 10 meses debido a infección, trombo u oclusión inducida por hiperplasia de la íntima ya sea en la anastomosis distal o en la vena de flujo de salida (Sistema de Datos Renales de los EE.UU.; Schild, y otros, J Vasc Access 9, 231-235 (2008)). Otros tipos de injertos, tales como los xenoinjertos yugulares internos bovinos descelularizados y vasos de aloinjertos humanos de cadáveres, son propensos a aneurisma, calcificación y trombosis y, por lo tanto, no han alcanzado una aceptación clínica amplia (Sharp y otros, Eur J Vasc Endovasc Surg 27, 42-44 (2004); Dohmen y otros, Tex Heart Inst J 30, 146-148 (2003); Madden y otros, Ann Vasc Surg 19, 686-691 (2005)). En situaciones donde se requieren vasos de diámetro pequeño (es decir, 3-4 mm), tales como el injerto de derivación debajo de la rodilla y en la arteria coronaria, se usa predominantemente la vasculatura propia del paciente (es decir, la arteria mamaria interna, la vena safena) porque los injertos sintéticos y los aloinjertos tienen tasas de permeabilidad inaceptablemente bajas (por ejemplo, la permeabilidad es  $<25$  % a los 3 años mediante el uso de injertos sintéticos y crioconservados en cirugías de derivación coronaria y periférica, en comparación con  $>70$  % para conductos vasculares autólogos) (Chard, y otros, J Thorac Cardiovasc Surg 94, 132-134 (1987); Albers, y otros, Eur J Vasc Endovasc Surg 28, 462-472 (2004); Laub, y otros, Ann Thorac Surg 54, 826-831 (1992); Collins, y otros, Circulation 117, 2859-2864 (2008); Harris y otros, J Vasc Surg 33, 528-532 (2001); Albers, y otros, J Vasc Surg 43, 498-503 (2006)). Por lo tanto, un injerto vascular versátil y disponible fácilmente, con una buena permeabilidad que resista la dilatación, la calcificación y la hiperplasia de la íntima, cubriría una necesidad clínica sustancial y creciente.

20 Hasta la fecha, los injertos vasculares formados por ingeniería tisular al sembrar células de médula ósea autólogas en un copolímero de L-lactida y e-caprolactona (Shin'oka, y otros, J Thorac Cardiovasc Surg 129, 1330-1338 (2005)), o mediante el cultivo de fibroblastos y células endoteliales (CE) autólogos sin una armazón (McAllister, y otros, Lancet 373, 1440-1446 (2009)), han mostrado resultados funcionales prometedores en ensayos clínicos tempranos. Hasta ahora, solo este último ha demostrado ser lo suficientemente fuerte para su uso en la circulación arterial. Este injerto específico para el paciente requiere un período de cultivo de 6-9 meses en el que los fibroblastos autólogos producen láminas de tejido. Las láminas se fusionan entre sí alrededor de un mandril de acero inoxidable (4,8 mm de diámetro), las capas fusionadas internas se deshidratan y el lumen del injerto se siembra con CE autólogas (McAllister, y otros, Lancet 373, 1440-1446 (2009)). Debido a los altos costos de producción ( $\geq 15.000$  \$ por injerto (McAllister, y otros, Regen Med 3, 925-937 (2008)) y el largo tiempo de espera (hasta 9 meses) para pacientes que requieren una intervención rápida, es poco probable que este enfoque se convierta en una práctica clínica estándar. El documento US2009/163990 describe constructos tubulares que comprenden armazones de ácido poliglicólico no tejido biodegradables de 75 mg/cc de densidad y 1 mm de grosor.

25 Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de constructos generados por ingeniería de tejidos eficaces, disponibles rápidamente, fiables y rentables que puedan funcionar a largo plazo, con efectos secundarios mínimos o nulos, in vivo.

## Resumen de la invención

30 La presente invención proporciona un constructo que incluye una armazón tubular de ácido poliglicólico biodegradable no tejido, de conformidad con la reivindicación 1, en donde la densidad del ácido poliglicólico es de 45 mg/cc a 75 mg/cc y dicha densidad es uniforme a través de toda la armazón tubular.

35 La longitud de la armazón tubular de ácido poliglicólico biodegradable puede ser de aproximadamente 1 cm a aproximadamente 100 cm. Preferentemente, la longitud de la armazón tubular de ácido poliglicólico biodegradable puede ser de aproximadamente 10 cm a aproximadamente 40 cm. El diámetro interior de la armazón tubular de ácido poliglicólico biodegradable puede ser mayor de aproximadamente 3 mm. Preferentemente, el diámetro interior de la armazón tubular de ácido poliglicólico biodegradable puede ser de aproximadamente 3 mm a aproximadamente 20 mm.

65 El grosor del ácido poliglicólico puede ser de 0,8 a 1,5 mm y dicho grosor es uniforme a través de toda la armazón tubular. Preferentemente, el ácido poliglicólico puede ser de aproximadamente 0,8 a aproximadamente 1,2 mm y dicho grosor es

uniforme a través de toda la armazón tubular. El grosor de las fibras en el ácido poliglicólico puede ser de 5 a 20  $\mu\text{m}$ . La porosidad del ácido poliglicólico puede ser de aproximadamente 90 % a aproximadamente 98 %.

5 Los constructos de la presente invención pueden incluir además soportes de politereftalato de etileno no biodegradables en cada extremo de la armazón tubular de ácido poliglicólico biodegradable. Los soportes de politereftalato de etileno no biodegradables pueden unirse a la armazón tubular de ácido poliglicólico biodegradable mediante cualquier medio conocido en la técnica. Preferentemente, los soportes de politereftalato de etileno se unen mediante suturas. La porosidad del politereftalato de etileno puede ser  $\geq 200$  cc/min/cm<sup>2</sup>. La armazón tubular de ácido poliglicólico biodegradable y los soportes de politereftalato de etileno no biodegradables pueden permitir la unión y el crecimiento de las células. En otras modalidades, pueden usarse otros polímeros no biodegradables para soportar cada extremo de la armazón tubular.

10 Los constructos de la presente invención están libres sustancialmente de contaminantes de metales pesados. Preferentemente, el constructo incluye solo cantidades traza de contaminantes de metales pesados seleccionados del grupo que consiste en: aluminio, bario, calcio, yodo, lantano, magnesio, níquel, potasio y zinc.

15 Los constructos de la presente invención pueden incluir además proteínas de la matriz extracelular dentro, y alrededor, de la armazón de ácido poliglicólico biodegradable. Preferentemente, el grosor de las proteínas de la matriz extracelular es mayor de aproximadamente 200 micrómetros en la porción más delgada de la matriz.

20 La presente invención proporciona, además, métodos para producir un constructo tubular de ácido poliglicólico que incluye (a) proporcionar una lámina de ácido poliglicólico biodegradable, en donde la densidad del ácido poliglicólico es de 45 mg/cc a 75 mg/cc y el grosor de la lámina de ácido poliglicólico es de 0,8 a 1,2 mm, (b) envolver la lámina de ácido poliglicólico alrededor de un mandril de manera que los bordes opuestos de la lámina de ácido poliglicólico se encuentren en una interfaz; (c) tirar de las fibras de ácido poliglicólico de cada borde opuesto de la lámina a través de la interfaz, y (d) formar una costura al entrelazar dichas fibras de ácido poliglicólico haladas de un lado de la interfaz con las fibras de ácido poliglicólico en el lado opuesto de la interfaz, en donde la densidad del ácido poliglicólico en la costura es de 45 mg/cc a 75 mg/cc y el grosor del ácido poliglicólico en la costura es de 0,8 a 1,5 mm, lo que produce de esta manera un constructo tubular de ácido poliglicólico biodegradable con una densidad de ácido poliglicólico uniforme. La presente invención proporciona, además, un constructo tubular de ácido poliglicólico biodegradable formado mediante los métodos descritos en la presente descripción.

25 El constructo puede seleccionarse del grupo que consiste en un injerto arteriovenoso, un injerto coronario, un conducto de derivación de arteria periférica, un reemplazo de trompa de Falopio y un conducto urinario. El mandril puede comprender cualquier material conocido en la técnica. Preferentemente, el mandril comprende un tubo de silicona permeable a los gases.

30 La etapa de entrelazamiento puede realizarse mediante cualquier método conocido en la técnica que permita que la costura permanezca intacta en las etapas de tratamiento subsecuentes. Preferentemente, el entrelazamiento se realiza con una aguja para fieltro.

35 Los métodos de la presente invención pueden incluir además, tratar el constructo tubular para eliminar contaminantes de metales pesados. Preferentemente, el constructo tubular se trata con uno o más solventes no polares, seguido de un tratamiento con un alcohol primario, tal como el etanol. Preferentemente, la costura permanece intacta después de dicho tratamiento. Este tratamiento puede realizarse, además, en la armazón biodegradable antes de la formación de un tubo.

40 Los métodos de la presente invención pueden incluir además, tratar el constructo tubular para aumentar la tasa de degradación del ácido poliglicólico y/o aumentar la humectabilidad del ácido poliglicólico. Preferentemente, el constructo tubular se trata con una base fuerte. Con mayor preferencia, la base fuerte es NaOH 1 M. Preferentemente, la costura permanece intacta después de dicho tratamiento. Este tratamiento puede realizarse, además, en la armazón biodegradable antes de la formación de un tubo.

45 Los métodos de la presente invención pueden incluir además, unir soportes de politereftalato de etileno no biodegradables al extremo de la armazón tubular de ácido poliglicólico biodegradable.

50 En la presente descripción se describe, pero no forma parte de la presente invención, un constructo tubular que comprende proteínas de la matriz extracelular y ácido poliglicólico que tiene un diámetro interno de  $\geq 3$  mm, en donde el constructo es inmune y resistente a la calcificación, en donde el ácido poliglicólico comprende menos del 33 % del área de sección transversal de dicho constructo y en donde el constructo es sustancialmente acelular, comprende menos del 5 % de células, menos del 2 % de células, menos del 1 % de células o no contiene células. Preferentemente, las células son células intactas. Preferentemente, el ácido poliglicólico comprende menos del 10 % del área de sección transversal del constructo. Con mayor preferencia, el ácido poliglicólico comprende menos del 5 % del área de sección transversal del constructo. Con la máxima preferencia, el ácido poliglicólico comprende menos del 3 % del área de sección transversal del constructo.

55 El constructo de proteínas de la matriz extracelular puede comprender una presión de estallido mayor de 2.000 mm Hg.

5 El constructo puede comprender una resistencia de sutura mayor de 120 g. El diámetro interior del constructo tubular puede ser de aproximadamente 3 mm a aproximadamente 20 mm. El grosor del constructo tubular puede ser mayor de aproximadamente 200 micrómetros en la porción más delgada del constructo. El constructo puede ser impermeable al fluido. Preferentemente, el constructo es impermeable a la fuga de fluido hasta al menos 200 mm Hg, al menos 300 mm Hg o al menos 400 mm Hg. La longitud del constructo es de aproximadamente 1 cm a aproximadamente 100 cm. Preferentemente, la longitud del constructo es de aproximadamente 10 cm a aproximadamente 40 cm.

10 Las proteínas de la matriz extracelular pueden comprender hidroxiprolina, vitronectina, fibronectina y colágeno tipo I, colágeno tipo III, colágeno tipo IV, colágeno VI, colágeno XI, colágeno XII, fibrilina I, tenascina, decorina, biglicano, versicano y asporina. Preferentemente, las proteínas de la matriz extracelular pueden comprender hidroxiprolina a > 40 µg/mg de peso seco. En alguna modalidad, el constructo no comprende elastina, MAGP1 y/o MAGP2. Preferentemente, las proteínas de la matriz extracelular se producen a partir de células alogénicas, autólogas o xenogénicas para el receptor deseado del constructo. Preferentemente, las proteínas de la matriz extracelular se orientan, en parte, circunferencialmente alrededor del constructo tubular.

15 El constructo puede comprender menos de 300 ng/cm de beta-actina. El constructo puede comprender menos de 3 % en peso seco de lípidos. El constructo puede comprender cantidades traza o cantidades no detectables de ADN genómico de doble cadena. Preferentemente, la cantidad de ADN es como se determina mediante electroforesis en gel.

20 El constructo induce poca o ninguna calcificación tras la implantación in vivo. Preferentemente, el constructo induce menos de 1 % de calcificación dentro de los 6 meses posteriores a la implantación. Con mayor preferencia, el constructo induce menos de 1 % de calcificación dentro de los 12 meses posteriores a la implantación. Con la máxima preferencia, el constructo no produce calcificación dentro de los 12 meses posteriores a la implantación.

25 El constructo induce poca o ninguna respuesta inmunitaria tras la implantación in vivo. Preferentemente, cuando se implanta como un injerto vascular, el constructo induce menos de 1 mm de engrosamiento de hiperplasia de la íntima en la vasculatura nativa y en el injerto en la anastomosis con el constructo a los 6 meses de la implantación. Con mayor preferencia, el constructo induce menos de 0,25 mm de engrosamiento de hiperplasia de la íntima en la vasculatura nativa en la anastomosis con el constructo a los 6 meses de la implantación.

30 El constructo no se dilata más de 50 % más allá del diámetro del implante después de la implantación. El constructo puede almacenarse de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 30 °C. Preferentemente, el almacenamiento de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 30 °C se tolera durante al menos 3 meses. Con la máxima preferencia, el almacenamiento de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 30 °C se tolera durante al menos 12 meses.

35 En la presente descripción se describen, pero no son parte de la presente invención, métodos para producir un constructo tubular que comprende (a) proporcionar un constructo tubular de ácido poliglicólico biodegradable, (b) sembrar células humanas en el pase 6 o menos en el constructo tubular de ácido poliglicólico biodegradable, (c) cultivar las células en condiciones de manera que las células secreten proteínas de la matriz extracelular en el constructo tubular de ácido poliglicólico biodegradable, (d) descelularizar el constructo en la etapa (c) de manera que el constructo es sustancialmente acelular y comprende menos de 5 % de células y en donde el constructo es inmune y resistente a la calcificación, y (e) degradar el constructo de ácido poliglicólico en la etapa (c) de manera que el ácido poliglicólico comprende menos de 33 % del área de sección transversal de dicho constructo, lo que produce de esta manera un constructo tubular descelularizado. La presente invención proporciona, además, un constructo tubular descelularizado formado mediante los métodos descritos en la presente descripción.

40 Preferentemente, el constructo es sustancialmente acelular, comprende menos de 2 % de células, menos de 1 % de células o no contiene células. Preferentemente, las células son células intactas. Las células pueden ser alogénicas, autólogas o xenogénicas para el receptor deseado. Preferentemente, las células son alogénicas.

45 Las células se obtienen de un solo donante o se obtienen de un banco de células, en donde las células en el banco de células se combinan a partir de una pluralidad de donantes. Preferentemente, las células se obtienen de un banco de células de una pluralidad de donantes. Preferentemente, cada donante tiene menos de 50 años de edad y/o no se le ha diagnosticado una enfermedad vascular. Las células pueden aislarse de la aorta humana. Preferentemente, las células pueden aislarse de la aorta torácica humana. Con mayor preferencia, las células comprenden células de músculo liso.

50 Preferentemente, las células están en el pase 5 o menos, en el pase 4 o menos, en el pase 3 o menos. Las células pueden cultivarse durante un período de cultivo de aproximadamente seis a aproximadamente 11 semanas. Las células pueden cultivarse en un medio que comprende contenido alto de glucosa, insulina, bFGF y/o EGF. Preferentemente, el medio comprende DMEM. Preferentemente, las células se cultivan en un medio que comprende de aproximadamente 11 % a aproximadamente 30 % de suero humano durante las primeras 2-6 semanas de cultivo y en un medio que comprende de aproximadamente 1 % a aproximadamente 10 % de suero humano durante el resto del período de cultivo (al menos 4 semanas, al menos 5 semanas). Con mayor preferencia, las células se cultivan en un biorreactor.

65 Las células pueden sembrarse en el constructo tubular de ácido poliglicólico biodegradable de aproximadamente 0,5 x 10<sup>6</sup> células por cm de longitud de constructo a aproximadamente 2 x 10<sup>6</sup> células por cm de longitud de constructo.

Preferentemente, cada célula de las células sembradas, o la progenie colectiva de cada célula, produce más de 1 ng de hidroxiprolina durante 9 semanas en cultivo.

5 A menos que se especifique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado que el conocido comúnmente por el experto en la técnica a la que pertenece esta invención. En la descripción, las formas singulares incluyen, además, el plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y reivindicaciones.

10 Breve descripción de las figuras

15 La Figura 1 es una ilustración esquemática del enfoque usado para producir constructos de proteínas de la matriz extracelular fácilmente disponibles. Cada constructo se genera en el laboratorio (etapa A) mediante el cultivo de células humanas en una armazón de polímero que se degrada a medida que las células producen proteínas de la matriz extracelular para formar (etapa B) un tejido. Después, se retira el material celular, lo que deja (etapa C) un constructo de matriz extracelular, que puede refrigerarse o almacenarse a temperatura ambiente, o mediante algún otro medio de almacenamiento hasta el momento en que el paciente lo necesite. Los constructos de proteínas de la matriz extracelular derivados de células pueden implantarse sin células (etapa D, diámetros  $\geq 6$  mm) o (etapa E) sembrarse con células endoteliales del receptor para aplicaciones de diámetro pequeño (3-4 mm).

20 Las Figuras 2A-2G son fotografías que muestran sitios de implantes y observaciones. La Figura 2A muestra un constructo de 6 mm derivado de células humanas (g) implantado entre la arteria axilar (a) y la vena braquial (v) en un modelo de babuino. La Figura 2B muestra un injerto arteriovenoso (g) al que se accedió por primera vez con agujas 16G a las 4 semanas posteriores al implante. La Figura 2C muestra un angiograma de un explante representativo que demuestra un injerto de patente (g). Se indican la anastomosis arterial (aa), la anastomosis venosa (va) y la vena braquial (v). La Figura 2E muestra un constructo de 3 mm derivado de células caninas (g) como una derivación carotídea, con grapas que ocluyen la arteria carótida intermedia (ca), en el implante. La Figura 2E muestra un angiograma representativo que demuestra la permeabilidad sin estrechamiento luminal a un año. La Figura 2F muestra un constructo de 3 mm de diámetro derivado de células caninas (g) implantado en el corazón. La Figura 2G muestra una tomografía computarizada que demuestra un injerto patente (g) sin dilatación a 1 mes.

25 Las Figuras 3A-3F son fotografías que muestran constructos humanos descelularizados, antes del implante. La Figura 3A muestra un constructo de proteínas de la matriz extracelular humana descelularizado de 6 mm de diámetro antes del implante. La Figura 3B muestra un constructo descelularizado representativo que demuestra la ausencia de células en secciones teñidas con H-E (la flecha apunta al PGA residual) y la estructura porosa típica de un constructo descelularizado. La Figura 3C muestra un constructo descelularizado teñido de manera fuerte y difusa para colágeno Tipo I. La Figura 3D muestra un constructo descelularizado teñido para el colágeno Tipo III organizado. La Figura 3E muestra un constructo descelularizado teñido para fibronectina organizada. La Figura 3F muestra un constructo descelularizado teñido para vitronectina organizada. Las áreas con tinción positiva para proteínas de la matriz extracelular se indican con puntas de flecha abiertas. En las Figura 3C-F, la alineación circunferencial de las proteínas de la matriz extracelular es evidente. Note que la tinción DAB enmascara la estructura porosa en la Figura C-F. Barras de escala, 100  $\mu\text{m}$ .

30 Las Figuras 4A-4I son fotografías que muestran constructos explantados remodelados in vivo. La Figura 4A muestra un constructo de proteínas de la matriz extracelular humana de 6 mm de diámetro explantado a partir del modelo de babuino a los 6 meses que demuestra la formación de una capa externa similar a adventicia suelta (g: injerto, a: "adventicia"). La Figura 4B muestra un constructo canino de 4 mm de diámetro explantado a partir de un modelo de derivación carotídea a 1 año (la flecha apunta a la línea de sutura anastomótica). La Figura 4C es una tinción de Movat que ilustra la elastina (negra) en un explante de babuino de 6 meses. La Figura 4D es una tinción de H-E de un explante de babuino de 6 mm de diámetro a los 6 meses que muestra las células que pueblan densamente las paredes del injerto cercanas a la anastomosis arterial (las puntas de flecha señalan hacia células teñidas en D-I). La Figura 4E muestra que después de 6 meses en el modelo de babuino, las células positivas a actina  $\alpha$  del músculo liso (marrón) poblaron la pared del constructo cerca de los sitios anastomóticos (nota: se observó una tinción concentrada debajo de la superficie luminal, pero las células en el lumen no eran positivas a actina). La Figura 4F muestra que estas células comenzaron a infiltrar el injerto medio de constructo a partir del tejido similar a la adventicia circundante (las flechas definen las profundidades de las paredes del injerto en las Figura 4F-4H). La Figura 4G muestra que en el modelo canino, se observaron células positivas a actina  $\alpha$  del músculo liso (verde) que se infiltran en las secciones de injerto medio de derivación de la arteria carótida canina a partir del tejido similar a la adventicia circundante a 1 mes. La Figura 4H muestra que en un año, se observaron células positivas a actina a través de la profundidad de las paredes del injerto canino. La Figura 4I muestra un constructo explantado de un babuino que muestra una tinción positiva para el factor de von Willebrand en células lumbinales (se muestra la sección cercana a la anastomosis). Barras de escala, 100  $\mu\text{m}$ .

35 Las Figuras 5A-5F son fotografías y gráficos que muestran que los constructos de proteínas de la matriz extracelular no eran inmunogénicos. La Figura 5A muestra que las inyecciones intradérmicas de material de injerto homogeneizado y PBS (control negativo) en babuinos a las 4 semanas posteriores a la implantación no mostraron endurecimiento o enrojecimiento visibles. La Figura 5B es una gráfica que ilustra la proliferación representativa de células T aisladas en el

implante (semana 0) y 24 semanas después del implante, después de la exposición a segmentos de PTFE (control negativo; no implantado) y constructos (marcados con TEVG), lo que demuestra que los injertos son tolerados inmunológicamente. La Figura 5C es una fotografía de una tinción H-E que muestra una gran población de células infiltradas en secciones anastomóticas de constructos a los 6 meses en el babuino. La Figura 5D muestra que solo una población escasa de células en secciones anastomóticas se tiñen positivamente para CD3 (marcador de linfocitos T) a los 6 meses en el babuino. La Figura 5E muestra que solo una escasa población de células en secciones anastomóticas se tiñen positivamente para CD20 (marcador de linfocitos B) a los 6 meses en el babuino. La Figura 5F muestra la ausencia de calcificación (falta de color rojo) en la tinción de rojo alizarina en constructos humanos explantados del modelo de babuino a los 6 meses. Las flechas señalan hacia células teñidas. Barras de escala, 300  $\mu$ m.

La Figura 6 es una ilustración esquemática en la que las células de un donante se usan para producir muchos constructos de proteínas de la matriz extracelular para muchos receptores.

La Figura 7 es una serie de fotografías que muestran un constructo polimérico tubular. La Figura 7A ilustra una densidad de PGA uniforme. La Figura 7B ilustra una densidad de PGA no uniforme, con regiones de densidad baja y alta. La Figura 7C ilustra un constructo polimérico tubular con una costura entrelazada uniformemente que coincide con la densidad global del constructo tubular y un anclaje PET. La Figura 7D ilustra un constructo polimérico tubular donde la costura está poco entrelazada y tiene una densidad variable (regiones de densidad alta y baja).

La Figura 8 son fotografías de hiperplasia de la íntima venosa. La Figura 8A ilustra la anastomosis venosa de un constructo de proteínas de la matriz extracelular de la invención. La Figura 8B ilustra una hiperplasia de la íntima venosa sustancial adyacente a un injerto de PTFE.

La Figura 9 es una serie de fotografías que muestran el uso de los constructos de proteínas de la matriz extracelular de la presente invención como conductos urinarios. La Figura 9A muestra que el conducto soporta anastomosis extremo a extremo y extremo a lado con uréteres, y presenta túneles en el plano retroperitoneal. En la piel, el conducto forma un estoma con la piel. La Figura 9B muestra el estoma en la piel del conducto de proteínas de la matriz extracelular, con orina desviada. Una endoprótesis vascular, que se usa habitualmente en la clínica para mantener un conducto abierto durante el proceso de curación quirúrgica, se muestra insertada en el conducto de proteína de la matriz extracelular a través del estoma en la piel. La Figura 9C muestra una bolsa de ostomía que recolecta la orina que drena desde el estoma del conducto de derivación urinaria. La Figura 9D muestra el conducto después de 28 días de exposición a la orina concentrada. La Figura 9E muestra que después de 4 semanas de exposición a la orina concentrada, los conductos resisten la cristalización y permanecen intactos física y mecánicamente.

La Figura 10 es una fotografía que muestra el uso de los constructos de proteínas de la matriz extracelular de la presente invención como un conducto de trompa de Falopio.

#### Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un constructo que incluye un polímero biodegradable de conformidad con la reivindicación 1, en donde la densidad del material polimérico es de 45 mg/cc a 75 mg/cc y dicha densidad es uniforme a través de toda la armazón tubular. Uniforme, como se usa en la presente, se define como no más de 30 %, no más de 15 %, no más de 10 %, no más de 5 %, no más de 4 %, no más de 3 %, no más de 2 %, no más de 1 % de variabilidad en la densidad en el 100 % del área superficial de la armazón. La armazón es tubular. El material polimérico es ácido poliglicólico. Preferentemente, la armazón es de fieltro. Estos constructos se denominan indistintamente en la presente descripción como "constructos poliméricos", "armazones poliméricas", "constructos de ácido poliglicólico (PGA)" o "armazones de ácido poliglicólico (PGA)"

La longitud de la armazón tubular de ácido poliglicólico biodegradable puede ser de aproximadamente 1 cm a aproximadamente 100 cm. Preferentemente, la longitud de la armazón tubular de ácido poliglicólico biodegradable puede ser de aproximadamente 10 cm a aproximadamente 40 cm. Con mayor preferencia, la longitud puede ser al menos 5, al menos 10, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 20, al menos 25 o al menos 30 cm de longitud. El diámetro interior de la armazón tubular de ácido poliglicólico biodegradable puede ser igual o mayor de aproximadamente 3 mm. Preferentemente, el diámetro interno de la armazón tubular de ácido poliglicólico biodegradable puede ser de aproximadamente 3 mm a aproximadamente 20 mm, tal como al menos 3 mm, al menos 4 mm, al menos 5 mm, o cualquier número entero hasta aproximadamente 20 mm.

El grosor del ácido poliglicólico puede ser de 0,8 a 1,5 mm y dicho grosor es uniforme a través de toda la armazón tubular. Preferentemente, el ácido poliglicólico puede ser de 0,8 a 1,2 mm. El grosor de las fibras en el ácido poliglicólico puede ser de 5 a 20  $\mu$ m. La porosidad del ácido poliglicólico puede ser de aproximadamente 90 % a aproximadamente 98 %.

Los constructos de la presente invención pueden incluir además soportes de politereftalato de etileno no biodegradables en cada extremo de la armazón tubular de ácido poliglicólico biodegradable. Los soportes de politereftalato de etileno no biodegradables pueden unirse a la armazón tubular de ácido poliglicólico biodegradable mediante cualquier medio conocido en la técnica. Preferentemente, los soportes de politereftalato de etileno se unen mediante suturas. La porosidad del politereftalato de etileno puede ser  $\geq$  200 cc/min/cm<sup>2</sup>. La armazón tubular de ácido poliglicólico biodegradable y los

soportes de politereftalato de etileno no biodegradables pueden permitir la unión y el crecimiento de las células. Alternativamente, pueden usarse otros polímeros no degradables como soportes en cada extremo de la armazón tubular.

5 Los constructos de la presente invención están libres sustancialmente de contaminantes de metales pesados. Preferentemente, el constructo incluye solo cantidades traza de contaminantes de metales pesados seleccionados del grupo que consiste en: aluminio, bario, calcio, yodo, lantano, magnesio, níquel, potasio y zinc. El aluminio puede presentarse en una cantidad de aproximadamente 1,5 ppm a aproximadamente 5 ppm. El bario puede presentarse en una cantidad de aproximadamente 0,03 ppm a aproximadamente 0,06 ppm. El calcio puede presentarse en una cantidad de aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 4 ppm. El yodo puede presentarse en una cantidad de aproximadamente 0,1 ppm a aproximadamente 0,04 ppm. El lantano puede presentarse en una cantidad de aproximadamente 0,05 ppm a aproximadamente 0,3 ppm. El magnesio puede presentarse en una cantidad de aproximadamente 0,5 ppm a aproximadamente 3,5 ppm. El níquel puede presentarse en una cantidad de aproximadamente 0,1 ppm a aproximadamente 1 ppm. El potasio puede presentarse en una cantidad de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 40 ppm. El zinc puede presentarse en una cantidad de aproximadamente 1 ppm a aproximadamente 5 ppm.

20 Los constructos de la presente invención pueden incluir además proteínas de la matriz extracelular dentro, y alrededor, de la armazón de ácido poliglicólico biodegradable. Preferentemente, el grosor de las proteínas de la matriz extracelular es mayor de aproximadamente 200 micrómetros en la porción más delgada del constructo.

25 La presente invención proporciona, además, métodos para producir un constructo tubular de ácido poliglicólico que incluye (a) proporcionar una lámina de ácido poliglicólico biodegradable, en donde la densidad del ácido poliglicólico es de 45 mg/cc a 75 mg/cc y el grosor de la lámina de ácido poliglicólico es de 0,8 a 1,2 mm, (b) envolver la lámina de ácido poliglicólico alrededor de un mandril de manera que los bordes opuestos de la lámina de ácido poliglicólico se encuentren en una interfaz; (c) tirar de las fibras de ácido poliglicólico de cada borde opuesto de la lámina a través de la interfaz, y (d) formar una costura al entrelazar dichas fibras de ácido poliglicólico haladas de un lado de la interfaz con las fibras de ácido poliglicólico en el lado opuesto de la interfaz, en donde la densidad del ácido poliglicólico en la costura es de 45 mg/cc a 75 mg/cc y el grosor del ácido poliglicólico en la costura es de 0,8 a 1,5 mm, lo que produce de esta manera un constructo tubular de ácido poliglicólico biodegradable con una densidad de ácido poliglicólico uniforme. La presente invención proporciona, además, un constructo tubular de ácido poliglicólico biodegradable formado mediante los métodos descritos en la presente descripción.

35 El mandril puede comprender cualquier material conocido en la técnica. Preferentemente, el mandril comprende un tubo de silicona permeable a los gases.

La etapa de entrelazamiento puede realizarse mediante cualquier método conocido en la técnica que permita que la costura permanezca intacta en las etapas de tratamiento subsecuentes. Preferentemente, el entrelazamiento se realiza con una aguja para fieltro.

40 Los métodos de la presente invención pueden incluir además, tratar el constructo tubular para eliminar contaminantes de metales pesados. Preferentemente, el constructo tubular se trata con uno o más solventes no polares y se trata con al menos un alcohol primario, tal como el etanol. Preferentemente, la costura permanece intacta después de dicho tratamiento. Este tratamiento puede realizarse, además, en la armazón biodegradable antes de la formación de un tubo.

45 Los métodos de la presente invención pueden incluir además, tratar el constructo tubular para aumentar la tasa de degradación del ácido poliglicólico y/o aumentar la humectabilidad del ácido poliglicólico. Preferentemente, el constructo tubular se trata con una base fuerte. Con mayor preferencia, la base fuerte es NaOH 1 M. Preferentemente, la costura permanece intacta después de dicho tratamiento. Este tratamiento puede realizarse, además, en la armazón biodegradable antes de la formación de un tubo.

50 Los métodos de la presente invención pueden incluir además, unir soportes de politereftalato de etileno no biodegradables al extremo de la armazón tubular de ácido poliglicólico biodegradable. Estos soportes pueden unirse antes o después de otros tratamientos del constructo tubular.

55 En la presente descripción se describe, pero no es parte de la invención, un constructo tubular que comprende proteínas de la matriz extracelular y un material polimérico que tiene un diámetro interno de  $\geq 3$  mm, en donde el constructo es inmune y resistente a la calcificación, en donde el material polimérico comprende menos de 33 % del área de sección transversal de dicho constructo y en donde el constructo es sustancialmente acelular y comprende menos de 5 % de células. La estimulación de la inmunidad se determina, en algunas modalidades, mediante la reacción a inyecciones intradérmicas de material de constructo en el receptor, a las 48 horas después de la inyección. Preferentemente, el material polimérico es ácido poliglicólico. Estos constructos se denominan indistintamente en la presente descripción como "constructos de proteínas de la matriz extracelular", "constructos descelularizados"; o pueden denominarse "injertos", "conductos" o "vasos" en dependencia del uso in vivo.

65 Los constructos de proteínas de la matriz extracelular pueden usarse en una serie de ubicaciones anatómicas y situaciones de enfermedad. El constructo puede seleccionarse del grupo que consiste en un injerto arteriovenoso, un

injerto coronario, un conducto de derivación de arteria periférica, un reemplazo de trompa de Falopio y un conducto urinario. Por ejemplo, los constructos de proteínas de la matriz extracelular son útiles como injertos arteriovenosos en pacientes sometidos a hemodiálisis; como injertos coronarios en la derivación de un bloqueo en pacientes, para derivar una arteria periférica enferma en un paciente con enfermedad arterial periférica (PAD) o como un conducto urinario. El diámetro y la longitud de los constructos de proteínas de la matriz extracelular variarán para estos usos diferentes, al igual que los puntos de unión quirúrgicos. Por ejemplo, un injerto coronario se unirá a la arteria coronaria, un injerto de arteria periférica se unirá a una arteria periférica y un conducto urinario conectará típicamente el(los) uréter(es) a la piel para formar un estoma.

Cada año en los EE.UU., aproximadamente 10.000 pacientes se someten a una cistectomía y requieren un conducto urinario para drenar la orina fuera del cuerpo (Healthcare Cost and Utilization Project (2007). N.I.S). En casi todos los casos, se extrae intestino del paciente para formar ya sea una desviación urinaria incontinente o una desviación urinaria continente que se cateteriza intermitentemente para drenar la orina mediante un estoma continente (Konety BR, Joyce GF, Wise M (2007) Bladder and upper tract urothelial cancer. J Urol 177: 1636-1645). Los pacientes pueden experimentar complicaciones en el lugar de extracción del intestino, lo que incluye fugas anastomóticas y peritonitis. Además, los conductos urinarios ileales pueden experimentar isquemia y necrosis, lo que puede conducir a perforación, ruptura anastomótica, problemas de estoma y fuga de orina del conducto. A largo plazo, muchos pacientes experimentan acidosis metabólica hiperclorémica crónica, debido a la reabsorción de electrolitos de la orina a través de la pared del conducto. Dado que los conductos ileales albergan bacterias, los pacientes suelen experimentar también infecciones del tracto urinario recurrentes y pielonefritis, ya que las bacterias del conducto infectan el sistema urinario más próximo. Por lo tanto, existe una importante necesidad médica de un método mejorado para la desviación urinaria que evite muchas de las complicaciones asociadas con el uso de conductos ileales (Konety BR, Allareddy V (2007) Influence of post-cystectomy complications on cost and subsequent outcome. J Urol 177: 280-287; Dahl DM, McDougan WS (2009) Use of intestinal segments and urinary diversion. En: Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC (eds) Campbell-Walsh Urology. 9a Edición).

Sorprendentemente, los constructos de proteínas de la matriz extracelular aquí descritos proporcionan propiedades superiores significativas en comparación con el ileon autólogo. Por ejemplo, no se necesita la resección del intestino del paciente, ya que se evita completamente la cirugía en el intestino. Como se describe en la presente descripción, el conducto urinario de la presente invención se fabrica previamente y se almacena, lo que lo hace disponible rápidamente para los pacientes. Dado que el constructo de proteínas de la matriz extracelular cuando se usa como un conducto urinario no absorbe activamente su contenido luminal, el riesgo de acidosis metabólica hiperclorémica se reduce sustancialmente. Dado que el constructo de proteínas de la matriz extracelular de la presente invención cuando se usa como un conducto urinario no alberga flora intestinal, los riesgos de infecciones recurrentes del tracto urinario se reducen notablemente. El constructo de proteínas de la matriz extracelular de la presente invención cuando se usa como un conducto urinario no produce moco, y por lo tanto, el riesgo de obstruir el estoma se reduce en comparación con el conducto ileal productor de moco. Dado que el constructo de proteínas de la matriz extracelular de la presente invención es inerte, no hay riesgo esencialmente de isquemia tisular debido a una vasculatura inadecuada. Más bien, las células huésped migran gradualmente hacia el conducto acelular y forman simultáneamente una red microvascular. Sin isquemia, se reduce el riesgo de estenosis estomal. Dado que el constructo de proteínas de la matriz extracelular de la presente invención puede cultivarse en diámetros de 3-20 mm o más, y con longitudes de hasta 100 cm, es posible producir conductos urinarios que tengan las dimensiones más adecuadas para la desviación de la orina a la superficie de la piel, el conducto urinario tolera la exposición crónica a la orina y resiste la difusión activa de orina a través de la pared del conducto.

La cicatrización de la trompa de Falopio es un problema importante que puede causar infertilidad. La infección, tal como la asociada con algunas enfermedades de transmisión sexual, puede causar que se forme tejido cicatricial en las trompas de Falopio. El tejido cicatricial, a su vez, bloquea o daña la trompa de Falopio. Una trompa de Falopio obstruida impide la fertilización del óvulo y una trompa de Falopio dañada puede conducir a embarazos ectópicos. En los Estados Unidos, más de 750.000 mujeres experimentan un episodio de enfermedad inflamatoria pélvica aguda cada año y, como resultado, 10-15 % de estas mujeres se vuelven infértiles (Enfermedad Inflamatoria Pélvica (PID, por sus siglas en inglés) - CDC Fact Sheet, National Center for HIV/AIDS, Viral Hepatitis, STD, and TB Prevention, Division of STD Prevention, septiembre de 2011). El cáncer de las trompas de Falopio afecta cada año aproximadamente 550 mujeres en los Estados Unidos (Vapiwala, N y Hill-Kayser, C, Fallopian Tube Cancer: The Basics, OncoLink, Abramson Cancer Center de la Universidad de Pennsylvania, 2010). La Figura 10 muestra, en un modelo porcino, que los constructos de proteínas de la matriz extracelular de la presente invención pueden coserse a una anastomosis de extremo a extremo para reemplazar un segmento extirpado de la trompa de Falopio.

El constructo tubular se descelulariza de manera que es sustancialmente acelular de manera que el constructo es resistente al sistema inmune y/o resistente a la calcificación. Preferentemente, el constructo es sustancialmente acelular, comprende menos de 2 % de células, menos de 1 % de células o no contiene células. Las células son células intactas. Las células pueden ser células vivas o células muertas.

El constructo tubular se trata para minimizar la cantidad de material polimérico presente. Preferentemente, el material polimérico es ácido poliglicólico. El material polimérico puede degradarse o eliminarse de manera que menos de 50 %, menos de 45 %, menos de 40 %, menos de 35 %, menos de 33 %, menos de 30 %, menos de 25 %, menos de 20 %, menos de 15 %, menos de 10 %, menos de 5 %, menos de 3 % o menos de 1 % del área de sección transversal del tejido comprende el material polimérico sintético. El cálculo del área de sección transversal no incluye el lumen.

La longitud y el diámetro del constructo de proteínas de la matriz extracelular pueden variar con la aplicación anatómica deseada. La longitud de la armazón del constructo de proteínas de la matriz extracelular puede ser de aproximadamente 1 cm a aproximadamente 100 cm. Preferentemente, la longitud es de aproximadamente 10 cm a aproximadamente 40 cm. Con mayor preferencia, la longitud puede ser al menos 5, al menos 10, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 20, al menos 25 o al menos 30 cm de longitud. El diámetro interno del constructo de proteínas de la matriz extracelular puede ser igual o mayor de aproximadamente 3 mm. Preferentemente, el diámetro interno es de aproximadamente 3 mm a aproximadamente 8 mm, tal como al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7 o al menos 8 mm. Con mayor preferencia, el diámetro interior puede ser de aproximadamente 3 mm a aproximadamente 20 mm.

Sorprendentemente, el constructo de proteínas de la matriz extracelular puede comprender una presión de estallido de al menos 600 mm, al menos 700 mm, al menos 800 mm, al menos 900 mm, al menos 1.000, al menos 1.100 mm, al menos 1.200 mm, al menos 1.300 mm, al menos 1.400 mm, al menos 1.500 mm, al menos 1.600 mm, al menos 1.700, al menos 1.800 mm, al menos 1.900 mm o al menos 2.000 mm Hg. La presión de estallido puede medirse mediante cualquier medio conocido en la técnica; por ejemplo, al inflar el constructo con un fluido a presiones aumentadas gradualmente, hasta que el constructo se rompe o forma un agarre discreto. Preferentemente, el constructo tiene una resistencia a la ruptura mayor de 2.000 mm Hg. Igualmente sorprendente, el constructo puede comprender una resistencia de sutura mayor de 60 g, 70 g, 80 g, 90 g o 120 g. Preferentemente, el constructo tiene una resistencia de sutura mayor de 120 g. La resistencia de la sutura puede medirse mediante cualquier medio conocido en la técnica; por ejemplo, al insertar una sutura 6-0 a través del constructo a una distancia de 2 mm del borde del constructo. El grosor del constructo tubular puede ser mayor de aproximadamente 200 micrómetros en la porción más delgada del constructo. El constructo puede ser impermeable al fluido. El fluido puede ser solución salina o un fluido biológico, tal como sangre u orina. Impermeable al fluido se define como la ausencia de flujo neto de fluido fuera del constructo después de llenar con fluido a presión atmosférica, a 200 mm Hg, a 300 mm Hg o a 400 mm Hg. Preferentemente, el constructo es impermeable a la fuga de fluido hasta al menos 200 mm Hg, al menos 300 mm Hg o al menos 400 mm Hg. Dado que las presiones normales en los vasos sanguíneos no superan los 120 mm Hg, y que las presiones sanguíneas severas de la Etapa 4 en la hipertensión alcanzan un máximo de hasta 230 mm Hg, los constructos de proteínas de la matriz extracelular proporcionados en la presente descripción resisten las fugas y el escurrimiento tanto en pacientes sanos como en enfermos. Dado que las presiones en los uréteres son de aproximadamente 30 mm Hg, este constructo también resiste la fuga de orina durante su uso como conducto urinario. Sin estar limitados por ninguna teoría, los constructos de proteínas de la matriz extracelular proporcionados en la presente descripción resisten las fugas y el escurrimiento porque las proteínas de la matriz extracelular (por ejemplo, colágeno) se empaquetan estrechamente en los constructos, con una densidad de  $856 \pm 221$  microgramos de hidroxiprolina por cm<sup>2</sup> de material de constructo.

Las proteínas de la matriz extracelular pueden comprender hidroxiprolina, vitronectina, fibronectina y colágeno tipo I, colágeno tipo III, colágeno tipo IV, colágeno VI, colágeno XI, colágeno XII, fibrilina I, tenascina, decorina, biglicano, versicano y asporina. Preferentemente, las proteínas de la matriz extracelular pueden comprender hidroxiprolina a  $> 40$  µg/mg de peso seco. Preferentemente, las proteínas de la matriz extracelular se producen a partir de células alogénicas, autólogas o xenogénicas. Preferentemente, las proteínas de la matriz extracelular se orientan, en parte, circunferencialmente alrededor del constructo tubular. La orientación circunferencial de las proteínas de la matriz extracelular proporciona un "anclaje" para las suturas. Las flechas en la Figura 3 resaltan la orientación circunferencial de las fibras. En contraste, tener una orientación predominantemente axial de la matriz extracelular no proporciona a las suturas una estructura a la cual anclarse; más bien la sutura se resbalaría a través de fibras alineadas axialmente.

El constructo puede comprender menos de 300 ng/cm de beta-actina. Preferentemente, el constructo comprende  $< 150$  ng/cm de beta-actina. La cantidad de beta-actina puede determinarse mediante cualquier medio conocido en la técnica; por ejemplo, mediante un ensayo ELISA. El constructo puede comprender menos de 3 % en peso seco de lípidos. La cantidad de lípido puede determinarse mediante cualquier medio conocido en la técnica; por ejemplo, mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas. El constructo puede comprender cantidades traza o cantidades no detectables de ADN genómico de doble cadena. Preferentemente, la cantidad de ADN es como se determina mediante electroforesis en gel.

El constructo induce poca o ninguna calcificación tras la implantación in vivo. Preferentemente, el constructo induce menos de 1 % de calcificación dentro de las 6 semanas, dentro de los 3 meses, dentro de los 6 meses, dentro de los 9 meses, o 12 meses después de la implantación. Con mayor preferencia, el constructo induce menos de 0,5 % de calcificación dentro de las 6 semanas, dentro de los 3 meses, dentro de los 6 meses, dentro de los 9 meses, o 12 meses después de la implantación. Con la máxima preferencia, el constructo no produce calcificación dentro de las 6 semanas, dentro de los 3 meses, dentro de los 6 meses, dentro de los 9 meses, o 12 meses después de la implantación. La calcificación puede determinarse mediante cualquier medio conocido en la técnica; por ejemplo, la calcificación se mide por el área porcentual del constructo que en un seccionamiento histológico da tinción positiva para el calcio, mediante el uso de una tinción histoquímica tal como la tinción con rojo alizarina.

El constructo es resistente al sistema inmunitario, de manera que el constructo induce poca o ninguna respuesta inmunitaria después de la implantación in vivo, como se define por la formación de ronchas y enrojecimiento a las 48 horas después de la inyección intracutánea de partículas de material de injerto en el receptor. Preferentemente, el constructo induce menos de 1 mm de engrosamiento de hiperplasia de la íntima en la vasculatura nativa en anastomosis

con el constructo a los 3 meses, 6 meses, 9 meses o 12 meses después de la implantación, cuando se implanta como un injerto vascular. Con mayor preferencia, el constructo induce menos de 1, 0,75, 0,5, 0,4, 0,3 o 0,25 mm de engrosamiento de hiperplasia de la íntima en la vasculatura nativa en anastomosis con el constructo a los 6 meses después de la implantación.

5

Sorprendentemente, los constructos de proteínas de la matriz extracelular no se dilatan más de 50 %, más de 40 %, más de 30 % o más de 20 % más allá de su diámetro en el momento del implante. Esto es muy beneficioso in vivo. También sorprendentemente, los constructos de proteínas de la matriz extracelular son muy estables en almacenamiento, y pueden almacenarse antes o después de la descclularización. El constructo puede almacenarse de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 30 °C durante al menos 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 18 o 24 meses sin que se comprometa su integridad y capacidad de implantación. La integridad de los constructos puede evaluarse mediante cualquier medio conocido en la técnica; por ejemplo, según lo evaluado por la resistencia de retención de la sutura retenida de al menos el 80 % del valor de inicio. Los constructos pueden almacenarse en cualquier tampón fisiológico adecuado conocido en la técnica. El tampón puede incluir inhibidores de proteasa o quelantes de iones. Esto es muy beneficioso, ya que los constructos de proteínas de la matriz extracelular están disponibles fácilmente (con un tiempo mínimo o nulo de espera) para su uso in vivo.

10

15

En la presente descripción se describen, pero no son parte de la invención, métodos para producir un constructo tubular que comprende (a) proporcionar un constructo tubular de ácido poliglicólico biodegradable, (b) sembrar células humanas en el pase 6 o menos en el constructo tubular de ácido poliglicólico biodegradable, (c) cultivar las células en condiciones de manera que las células secreten proteínas de la matriz extracelular en el constructo tubular de ácido poliglicólico biodegradable, (d) descclularizar el constructo en la etapa (c) de manera que el constructo sea sustancialmente celular y comprenda menos de 5 % de células y en donde el constructo es inmune y resistente a la calcificación, y (e) degradar el constructo de ácido poliglicólico en la etapa (c) de manera que el ácido poliglicólico comprenda menos de 33 % del área de sección transversal de dicho constructo, lo que produce de esta manera un constructo tubular descclularizado. La presente invención proporciona, además, un constructo tubular descclularizado formado mediante los métodos descritos en la presente descripción.

20

25

El constructo tubular se descclulariza de manera que es sustancialmente acelular de manera que el constructo es resistente al sistema inmune y/o resistente a la calcificación. Preferentemente, el constructo es sustancialmente acelular, comprende menos de 2 % de células. Con mayor preferencia, el constructo es sustancialmente acelular, comprende menos de 1 % de células. Con la máxima preferencia, el constructo no contiene células. Por lo tanto, en la etapa de descclularización se eliminan más de 25 %, más de 40 %, más de 50 %, más de 75 %, más de 85 %, más de 90 %, más de 95 %, más de 98 % o más de 99 % de las células sembradas en el constructo tubular de ácido poliglicólico biodegradable. Las células pueden ser alogénicas, autólogas o xenogénicas para el huésped en el que se implantará el constructo. Preferentemente, las células son alogénicas.

30

35

Las células se obtienen de un solo donante o se obtienen de un banco de células, en donde las células en el banco de células se combinan a partir de una pluralidad de donantes. Preferentemente, las células se obtienen de un banco de células de una pluralidad de donantes. Preferentemente, cada donante tiene menos de 50 años de edad y/o no se le ha diagnosticado una enfermedad vascular. Las células pueden aislarse de la aorta humana, la arteria femoral, la arteria ilíaca, la arteria carótida, la arteria radial, el uréter, la pared de la vejiga o la piel. Preferentemente, las células se aíslan de la aorta humana. Con mayor preferencia, las células se aíslan de la aorta torácica humana. Las células pueden comprender células de músculo liso, células mesenquimales, fibroblastos, fibrocitos y/o células endoteliales. Preferentemente, las células comprenden células de músculo liso.

40

45

Las células sembradas son células de pase bajo, que se han pasado menos de 10, menos de 5, menos de 5, menos de 4, menos de 3 o menos de 2 veces. Preferentemente, las células están en el pase 3 o menos. Las células pueden cultivarse durante un período de cultivo de aproximadamente seis a aproximadamente 11 semanas. La armazón polimérica puede estar en cualquier forma durante la fase de cultivo. Puede estar en la forma definitiva, o puede dársele forma después de la fase de cultivo. Preferentemente, la armazón es tubular. Alternativamente, la armazón se le da forma en una forma tubular después del cultivo. El cultivo de las células puede realizarse mediante el uso de cualquier medio y equipo convencional, y se tienen en cuenta las condiciones nutricionales, de oxigenación, de temperatura, mecánicas y de presión. El medio puede comprender, opcionalmente, suero bovino, suero porcino, suero ovino, suero equino o suero humano. Dichos sueros pueden proporcionar factores de crecimiento y componentes conocidos o desconocidos para mejorar las propiedades del proceso de cultivo. A medida que las células crecen en cultivo en la armazón, secretan matriz extracelular de colágeno. Preferentemente, las células se cultivan en un medio que comprende 20 % de suero humano durante las primeras 2-6 semanas de cultivo y 10 % de suero humano por el resto del período de cultivo. Con mayor preferencia, las células se cultivan en un biorreactor.

50

55

60

Las células pueden sembrarse en el constructo tubular de ácido poliglicólico biodegradable de aproximadamente  $0,5 \times 10^6$  células por cm de longitud de constructo a aproximadamente  $2 \times 10^6$  células por cm de longitud de constructo. Preferentemente, cada célula de las células sembradas, o la progenie colectiva de cada célula, produce más de 1 ng de hidroxiprolina durante 9 semanas en cultivo.

65

Los métodos de la presente invención pueden incluir además: antes de la implantación en un paciente, sembrar células en el constructo tubular descelularizado. Las células pueden incluir células de músculo liso o células endoteliales. Preferentemente, las células son células endoteliales. Las células pueden ser células alogénicas o autólogas. Preferentemente, las células son células autólogas. Con la máxima preferencia, las células son células endoteliales autólogas.

Los constructos de proteínas de la matriz extracelular descelularizados tienen varias ventajas sobre los vasos cadavéricos humanos descelularizados. En primer lugar, la vasculatura humana de cadáver tiene pequeñas bifurcaciones que deben ligarse, mientras que los tejidos obtenidos por ingeniería consisten en un tubo sin bifurcaciones. En segundo lugar, los constructos de proteínas de la matriz extracelular descelularizados tienen una estructura de tejido suelto sin capas de elastina lamelar. Esta estructura suelta permite que las soluciones de descelularización permeen fácilmente los tejidos obtenidos por ingeniería para eliminar el material celular sin una exposición excesiva que pueda dañar la integridad de la matriz extracelular, y puede mejorar además la repoblación celular in vivo. En tercer lugar, el uso de un enfoque de constructos de proteínas de la matriz extracelular descelularizados maximiza el impacto de los donantes de tejidos sanos al permitir la producción de un gran número de injertos por donante, mientras que el enfoque de injerto vascular de cadáveres descelularizados tiene cantidades limitadas de tejido vascular disponible por donante con diámetros apropiados para procedimientos quirúrgicos cardiovasculares comunes. Los constructos de proteínas de la matriz extracelular pueden crearse en una variedad de diámetros que pueden coincidir de manera más adecuada con la vasculatura arterial nativa derivada. Por el contrario, los vasos de cadáveres humanos descelularizados no pueden crearse para un diámetro particular, y puede producirse una falta de coincidencia de tamaño entre el vaso nativo pequeño y el injerto de derivación grande, lo que puede resultar en tasas de permeabilidad disminuidas.

Los constructos pueden descelularizarse mediante el uso de cualquier medio conocido en la técnica; por ejemplo, como se describió anteriormente (Dahl, y otros, Cell Transplantation 12, 659-666 (2003)). Una solución de descelularización preferida comprende solución salina tamponada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés) con hidróxido de sodio 0,12 M, cloruro de sodio 1 M y EDTA 25 mM, que contiene ya sea CHAPS 8 mM o SDS 0,07-1,8 mM. Otra solución de descelularización preferida no comprende SDS. Los métodos de descelularización de la presente invención pueden incluir una etapa de benzonasa para digerir el ADN. Preferentemente, la etapa de benzonasa incluye una solución que comprende benzonasa 2 U/ml, Tris 47 mM, cloruro de magnesio 1,4 mM y cloruro de sodio 19 mM, a pH 8,0.

La presencia de fragmentos de PGA residuales dispersos en los constructos de proteínas de la matriz extracelular en el momento del implante no es preocupante, ya que el PGA es un material de sutura degradable aprobado por la FDA con productos de degradación que se metabolizan fácilmente. Además, el PGA se ha usado como un componente de injerto vascular sin ningún efecto negativo conocido en la remodelación vascular (Shin'oka, y otros, J Thorac Cardiovasc Surg 129, 1330-1338 (2005)). Los injertos derivados de células humanas producidos en este estudio fueron un orden de magnitud más fuertes que los descritos en informes anteriores que también usaron PGA como soporte para la creación de tejido (Poh, y otros, Lancet 365, 2122-2124 (2005); McKee, y otros, EMBO Rep. 4, 633-638 (2003)). Sin embargo, es importante tener en cuenta que estos informes anteriores usaron células venosas humanas o células de aorta humana disponibles comercialmente en países elevados (Poh, y otros, Lancet 365, 2122-2124 (2005); McKee, y otros, EMBO Rep 4, 633-638 (2003)). En informes anteriores, el uso de suturas de PGA densas para coser láminas de PGA en tubos dejó una cantidad sustancial de PGA residual en constructos de proteínas de la matriz extracelular, lo que disminuyó las resistencias de los constructos de proteínas de la matriz extracelular (Dahl, y otros, Ann Biomed Eng 35, 348-355 (2007)).

En aplicaciones de gran diámetro, tales como la cirugía de derivación periférica por encima de la rodilla y el acceso a hemodiálisis, los injertos vasculares de PTFE funcionan lo suficientemente bien como para justificar el uso clínico de rutina (Harris, y otros, J Vasc Surg 33, 528-532 (2001)). Por lo tanto, pueden usarse constructos de proteínas de la matriz extracelular de gran diámetro sin la siembra de CE lumenales. Sin embargo, para aplicaciones de diámetros pequeños, ha sido extremadamente difícil encontrar un injerto vascular funcional que no sea la propia vasculatura del paciente (Harris, y otros, J Vasc Surg 33, 528-532 (2001)), que es altamente distensible (Tabla 3) y contiene CE. Para minimizar el riesgo de oclusión del injerto, las CE se sembraron en constructos de proteínas de la matriz extracelular antes del implante en los contextos periféricos y coronarios de pequeño diámetro para proporcionar una superficie luminal antitrombogénica. Las CE se aislaron de las arterias o venas periféricas de perros antes de someterse a una derivación con constructos de proteínas de la matriz extracelular. Esto es similar a los enfoques de extracción de venas periféricas que se informaron anteriormente para el aislamiento de CE para la siembra de injertos vasculares (McAllister, y otros, Lancet 373, 1440-1446 (2009); Deutsch, y otros, J Vasc Surg 49, 352-362 (2009)). Las CE autólogas también podrían aislarse más rápidamente del tejido adiposo (Arts, y otros, Lab Invest 81, 1461-1465 (2001)) o de la sangre circulante (Kalka, y otros, Proc Nat Acad Sci 97, 3422-3427 (2000); Hill, y otros, New Eng J Med 348, 593-600 (2003)), lo que podría reducir el tiempo de espera del paciente para la endotelialización de semanas a días o posiblemente incluso a horas.

La tasa de permeabilidad observada del 83 % para constructos de proteínas de la matriz extracelular de diámetro pequeño con escasa cobertura luminal de CE sugiere que no se requiere una cobertura luminal completa de CE antes del implante para el desempeño del injerto en el contexto de la terapia antiplaquetaria sistémica durante la duración del implante. Además, se observa una escasa cobertura de las CE en el implante en los injertos de vena safena, que a menudo no poseen endotelio durante el aislamiento del injerto (Roubos, y otros, Circulation 92, 1131-36 (1995)). Es posible que la presencia de CE dispersas en el momento del implante ayude a mantener la permeabilidad in vivo, ya sea al proporcionar una liberación suficiente de señales antitrombogénicas o al ayudar en el reclutamiento de las CE del receptor a la

superficie luminal del constructo de proteínas de la matriz extracelular (Lee, y otros, *Circulation* 114, 150-159 (2006)). Por otro lado, los constructos de proteínas de la matriz extracelular pueden ser menos trombogénicos que otros materiales sintéticos de injerto vascular y pueden funcionar sin CE en la superficie luminal al momento del implante.

5 Los efectos funcionales de inmunogenicidad (hiperplasia de la íntima, dilatación del aneurisma o calcificación a largo plazo (Sclafani, y otros, *Arch Facial Plast Surg* 2, 130-136 (2000); Mitchell y Libby, *Circ Res* 100, 967-978 (2007); Yankah y Wottge, *J Card Surg* 12, 86-92 (1997)) no se observaron en estudios realizados en babuinos o caninos, lo que demuestra que los injertos vasculares obtenidos por ingeniería tisular descritos no eran inmunogénicos. En contraste, las proteínas de la matriz extracelular xenogénica discordantes y las células alogénicas (que se encuentran en los xenoinjertos vasculares bovinos y los aloinjertos vasculares crioconservados de cadáver humano, respectivamente) desencadenan respuestas inmunitarias y sus efectos secundarios funcionales (Allaire, y otros, *Surgery* 122, 73-81 (1997); Carpenter, y Tomaszewski, *J Vasc Surg* 27, 492-499 (1998)). Los constructos de proteínas de la matriz extracelular resistieron la formación de hiperplasia de la íntima en implantes a largo plazo. Los constructos de proteínas de la matriz extracelular demostraron menos hiperplasia de la neointima a los 6 meses como injertos arteriovenosos que el PTFE a 1 mes como injertos de derivación arterial (Lumsden, y otros, *J Vasc Surg* 24, 825-833 (1996)), lo cual es alentador dado que los injertos arteriovenosos desencadenan típicamente un engrosamiento de la íntima más sustancial que los injertos de derivación arterial. Dado que la derivación de la arteria carótida de extremo a lado se ha descrito como un modelo que produce un extensa hiperplasia de la íntima en un mes (Kapadia, y otros, *J Surg Res* 148, 230-237 (2008)), la ausencia de hiperplasia de la íntima en un año en los estudios de derivación periférica canina es sorprendente.

20 Los constructos de proteínas de la matriz extracelular de la presente invención están disponibles sin un tiempo de espera significativo para el paciente y representan un avance sustancial sobre los enfoques de ingeniería de tejidos completamente autólogos, en donde los pacientes deben esperar largos períodos de tiempo para que se cultiven los injertos. Los constructos son funcionales como conductos arteriovenosos y como derivaciones arteriales de calibre pequeño en las circulaciones periférica (carótida) y coronaria. Los conductos usados anteriormente en la clínica han experimentado una hiperplasia de la íntima, aneurisma y calcificación sustancial. De manera alentadora, los constructos de proteínas de la matriz extracelular descelularizados resisten una hiperplasia de la íntima, dilatación y calcificación sustancial en diversos modelos de animales grandes. Estos datos apoyan el uso de constructos de proteínas de la matriz extracelular humana descelularizados en una gama de aplicaciones vasculares para pacientes que no tienen un conducto vascular autólogo disponible.

25 A continuación, se proporcionan ejemplos para ilustrar adicionalmente diferentes características de la presente invención. Los ejemplos ilustran, además, una metodología útil para la práctica de la invención. Estos ejemplos no limitan la invención reivindicada.

35 Ejemplo 1

Formación de Armazón Polimérica: Mida el ancho y la longitud apropiados de la malla de PGA (fieltro de ácido poliglicólico) requerida y corte a la medida. Por ejemplo, 3 mm - 1,35 cm X longitud deseada; 4 mm - 1,66 cm X longitud deseada; o 6 mm - 2,35 cm X longitud deseada. La malla de PGA puede obtenerse de Biomedical Structures (1 mm de grosor, 50 mg/cc (intervalo 45-58), 20X30 cm). Envuelva la malla alrededor del tubo de silicona del tamaño apropiado cortado 10 cm más largo que la longitud de la malla. Use una aguja para fieltro para halar un hilo de fibra de un lado de la malla al otro lado para entrelazar las fibras de PGA a lo largo de la costura. Repita todo a lo largo del borde de la costura. Entrelace las fibras firmemente contra el tubo de silicona para crear una forma de vaso/tubo de la malla. La costura no debe ser más gruesa que el resto del tubo. Después, se asegura la costura mediante la reparación de desgarres, orificios o puntos delgados en todo el tubo de malla

50 El PGA es idealmente 45-75 mg/cc. Las regiones de densidad baja (< 45 mg/cc) carecen de un número suficiente de fibras de PGA para entrelazar una costura sin orificios. Las regiones de densidad baja también conducen a una unión celular reducida, y la unión celular deficiente puede conducir a una producción local insuficiente de matriz extracelular. El PGA de densidad alta (> 75 mg/cc) se asocia con una densidad mayor de residuos de PGA en el producto final. La Figura 7a muestra un fieltro de PGA de densidad uniforme con densidad en el intervalo de 45-75 mg/cc. La Figura 7b muestra un fieltro de PGA de densidad no uniforme, con regiones de densidad inaceptablemente baja (< 45 mg/cc) que son inaceptables para el uso y regiones de densidad alta (> 75 mg/cc) que pueden conducir a un aumento de PGA residual en el producto final.

60 El método de entrelazamiento de fibra se usa para convertir las láminas de PGA (ver lámina de PGA en la Figura 7a) en tubos. El método de entrelazamiento consiste en envolver una tira de PGA alrededor del mandril de silicona y hacer coincidir los bordes de PGA en una interfaz. A continuación, las fibras de PGA de cada lado de la tira se halan a través de la interfaz y se insertan entre las fibras en el lado opuesto de la interfaz. Debe tirarse de una cantidad suficiente de fibras para que la "costura" sea lo suficientemente fuerte como para resistir el subsecuente lavado y tratamiento de la superficie. Las fibras también deben tirarse de tal manera que la densidad de la costura coincida con la del resto de la armazón tubular (ver Figura 7c), para que las células se distribuyan uniformemente alrededor del tubo de PGA y produzcan un tejido uniforme. Si la costura no es uniforme (ver Figura 7d), las áreas de densidad muy baja se convertirán en orificios durante el proceso de tratamiento de la superficie con NaOH. Además, las áreas de densidad baja en la costura de PGA pueden conducir a una siembra de células local deficiente, lo que puede conducir a un punto delgado en el injerto final.

Las áreas de densidad alta en la costura, como se muestra en la Figura 7d, pueden aumentar localmente los residuos de PGA en el producto final. Los residuos concentrados localmente de PGA en los injertos pueden reducir localmente la resistencia del injerto (Dahl y otros Ann Biomed Eng 35 (3):348-355 (2007))

5 Corte el material de politereftalato de etileno (PET) (material Dacron) en segmentos de 1 cm, aproximadamente 6-7  
 cordoncillos. El material Dacron puede obtenerse de Maquet (Producto Núm. 174408, Código C C1768, D 8 mm x L 50  
 cm, porosidad media de 260 cc/min/cm<sup>2</sup>). Como el Dacron no se recoge fácilmente, corte una cuña triangular pequeña  
 10 en el manguito de Dacron para que se ajuste a un tubo de 3 o 4 mm. Cuando el Dacron se sutura a la malla, cierre la cuña  
 triangular para que encaje firmemente en la malla y el tubo de silicona. Corte una porción pequeña, aproximadamente 3  
 cordoncillos, en el manguito de Dacron para acomodar la unión del tubo de 6 mm al biorreactor. Mediante el uso de la  
 sutura Surgipro 4.0 II, coser primero la cuña para ajustar a un tubo de 3 o 4 mm, después sujetar el manguito al tubo de  
 malla de PGA mediante el uso de puntos de sutura de cirujanos. Cosa puntadas corridas a lo largo de la parte superior  
 del manguito para crear un cierre de cordón en los biorreactores. El constructo tubular de PGA puede almacenarse o  
 15 tratarse como se describe a continuación.

La configuración tubular de PGA que se muestra en la Figura 7c permite que las células se siembren y después crezcan  
 en forma tubular. Un manguito de politereftalato de etileno (PET) que se muestra en la Figura 7c soporta el crecimiento  
 hacia dentro del tejido y de esta manera se integra con el tejido en crecimiento. La propiedad no degradable del PET le  
 permite servir como ancla al biorreactor para sostener el tejido a una longitud fijada durante el cultivo. En contraste, el  
 20 tubo de PGA se degrada durante la fase de crecimiento del tejido. El diámetro interior del tubo de PGA se define por el  
 diámetro exterior del mandril alrededor del cual se entrelaza la armazón de PGA, y en este caso, el mandril se hace de  
 silicona. La Figura 7c muestra un mandril de silicona con un diámetro exterior de 6 mm, y el tubo de PGA formado  
 alrededor del mandril de silicona tiene un diámetro interior de 6 mm. A medida que se forma el tejido, las células  
 25 contráctiles contraen el polímero y el tejido alrededor del tubo de silicona de manera que el diámetro interior del tejido  
 resultante también se define por el diámetro exterior del tubo de silicona. El diámetro interno del tubo de PGA (y el diámetro  
 exterior del mandril del tubo de silicona) producido fácilmente está en el intervalo de 3-6 mm, y pueden crearse tejidos  
 con diámetros más pequeños o más grandes mediante el uso de un tubo de silicona con el diámetro deseado.

Se usa un proceso de lavado para eliminar metales pesados, lubricantes y otros contaminantes. El tubo de PGA se coloca  
 30 en un mandril y se lava con más o más solventes no polares y al menos un alcohol primario, tal como etanol, durante al  
 menos 30 minutos mientras se agita a 25 rpm. Secar los tubos de PGA durante toda la noche.

La Tabla 1 muestra que este método de lavado elimina sustancialmente los contaminantes de metales pesados. La  
 35 presencia y/o la cantidad de contaminantes de metales pesados puede determinarse mediante cualquier medio conocido  
 en la técnica; por ejemplo, mediante espectroscopía de masas.

Tabla 1.

	Antes del lavado, PPM	Después del lavado, PPM
Aluminio	15	2,3
Bario	0,79	<0,05
Calcio	35	<7
45 Yodo	170	<0,07
Lantano	5	<0,1
Magnesio	4,5	<2
50 Níquel	3,5	0,31
Potasio	120	<20
Zinc	11	2,7

55 Se ha demostrado que el tratamiento del PGA con NaOH aumenta la tasa de degradación del PGA. Por ejemplo, la  
 ausencia de tratamiento con NaOH dio como resultado una pérdida de masa del 50 % dentro de las 8,5 semanas, pero  
 1-3 minutos de tratamiento con NaOH 1 M dio como resultado una pérdida de masa del 65-70 % dentro de las 8,5 semanas  
 (Prabhakar y otros, (2003) Engineering porcine arteries: effects of scaffold modification. J Biomed Mat Res 67 A:303-311).

60 El tubo de PGA se degrada a medida que el tejido se cultiva en el biorreactor. A medida que el PGA se degrada, las  
 células producen proteínas de la matriz extracelular que forman la mayor parte de la masa de injerto final. Como ejemplo,  
 considere lo siguiente:

65 Tiempo 0 de PGA, antes del cultivo en biorreactor:

Densidad de lámina de PGA: 55 mg/cc

Volumen del Tiempo 0 de PGA en un injerto de 6 mm de diámetro: 0,235 cc/cm de tubo

5 La densidad del Tiempo 0 de PGA en un injerto de 6 mm de diámetro es entonces:  $(55 \text{ mg/cc}) * (0,235 \text{ cc/cm de tubo}) = 12,9 \text{ mg de PGA/cm de injerto}$ .

PGA en el constructo de proteínas de la matriz extracelular final, después del cultivo en biorreactor y la descelularización como se describe a continuación:

10 Pérdida de masa de PGA después de 8,5 semanas en un ambiente acuoso a 37 °C: 30 % de la masa de PGA permanece después de 8,5 semanas.

15 Masa de PGA por cm de injerto:  $(30 \%) * (12,9 \text{ mg de PGA/cm de injerto}) = 3,9 \text{ mg de PGA/cm de injerto}$

Peso húmedo promedio de un injerto de 6 mm: 600 mg de injerto/cm de injerto

20 Masa de PGA por masa de injerto:  $(3,9 \text{ mg de PGA/cm de injerto}) / (600 \text{ mg de injerto/cm}) = 0,0065 \text{ mg de PGA/mg de injerto}$ .

Por lo tanto, el PGA constituye < 1 % de la masa hidratada final en este ejemplo. De manera similar, el uso de la especificación de densidad de PGA máxima de 75 mg de PGA/cc de PGA en el mismo conjunto de cálculos produciría un injerto con PGA como < 1 % de la masa final del injerto (0,0088 mg de PGA/mg de injerto).

25 Ejemplo 2

Uso animal: Todos los procedimientos se aprobaron por sus respectivos Comités de cuidado y uso de animales, lo que incluye la Duke University, East Carolina University y SyneCor. Los animales recibieron atención humanitaria de acuerdo con la "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (NIH, 1996). Todas las cirugías y angiografías se realizaron de forma estéril con anestesia general. Después de cada cirugía, se confirmó la permeabilidad del injerto, se cerraron las heridas y se recuperaron los animales. Los animales se anticoagularon con heparina (1.000-5.000 U) en el momento del implante. Los babuinos recibieron aspirina (10 mg/kg) y los perros recibieron terapia antiplaquetaria doble (325 mg de aspirina/75 mg de clopidogrel), de forma preoperatoria diariamente hasta el final del estudio.

35 Formación de constructos de proteínas de la matriz extracelular: Las aortas humanas se obtuvieron de una Asociación Americana de Bancos de Tejidos (AATB) acreditada y de un Banco de tejidos registrado por la FDA (CryoLife, Inc.), y cumplieron con los criterios para la implantación (FDA 21 CFR1271, AATB Standards for Tissue Banking, y los criterios internos de aceptación de CryoLife). Las células musculares lisas (SMC, por sus siglas en inglés) humanas se aislaron de aortas de donantes (edades 17-49) que consintieron para el uso en la investigación y se analizaron para determinar la carga biológica (contaminantes bacterianos y hongos aeróbicos), esterilidad, micoplasma y endotoxinas. Las células se almacenaron en vapor de nitrógeno líquido (-135 °C) antes de su uso. Las células de múltiples donantes se combinaron para el cultivo de injertos de donantes combinados. Se usaron células humanas en el pase 2.

45 Las SMC caninas se aislaron a partir de las arterias carótidas y femorales caninas, eran alogénicas con respecto al receptor del constructo y se usaron en el pase 2-4.

50 Mediante el uso de un proceso aséptico, las células (ya sea humanas o caninas) se sembraron en armazones tubulares de fieltro de ácido poliglicólico (6 mm de diámetro interno para constructos humanos y 3 o 4 mm de diámetro interno para constructos caninos) y se deformaron cíclicamente (2,5 % a 2,75 Hz) (Niklason, y otros, Science 284, 489-493 (1999)) en un biorreactor para producir el constructo. El medio para el crecimiento de constructos humanos fue DMEM de contenido alto de glucosa con 20 % de suero, 5 miligramos de insulina por litro, 5 microgramos de bFGF por litro, 1 microgramo de EGF por litro, 100.000 U de penicilina G por litro, 3 microgramos de sulfato de cobre por litro, 50 miligramos de L-prolina por litro, 40 miligramos de L-alanina por litro, 50 miligramos de glicina por litro y 50 miligramos de ácido ascórbico por litro, y se cambió tres veces por semana. El medio para el crecimiento de constructos caninos fue DMEM de contenido bajo de glucosa con 20 % de suero, 10 ng/ml de PDGF-BB, 10 ng/ml de bFGF, 500 U/ml de penicilina G, 3 ng/ml de sulfato de cobre, 50 ng/ml de L-prolina, 20 ng/ml de L-alanina y 50 ng/ml de glicina, y se cambió una vez por semana. Se añadió ácido L-ascórbico tres veces por semana a los cultivos de constructos de proteínas de la matriz extracelular canina.

60 Después de 7-10 semanas de cultivo, los constructos se descelularizaron mediante el uso de un procesamiento aséptico. Como se describió anteriormente (Dahl, y otros, Cell Transplantation 12, 659-666 (2003)), las soluciones de descelularización comprendían solución salina tamponada con fosfato (PBS) con hidróxido de sodio 0,12 M, cloruro de sodio 1 M y EDTA 25 mM, que contiene CHAPS 8 mM o SDS 0,07-1,8 mM. Además, se empleó un método alternativo de descelularización, en el que se eliminó el SDS. Además, puede añadirse una etapa de benzonasa para digerir el ADN, mediante el uso de 2 U/ml de Benzonasa, Tris 47 mM, cloruro de magnesio 1,4 mM y cloruro de sodio 19 mM, a pH 8,0. Los constructos de proteínas de la matriz extracelular se expusieron a cada solución por hasta 6 horas a temperatura ambiente, y después se lavaron con PBS. Todos los constructos de proteínas de la matriz extracelular se descelularizaron antes de la prueba mecánica, la siembra de células endoteliales y la implantación. Los constructos de proteínas de la

matriz extracelular descelularizados se almacenaron a 4 °C en solución salina tamponada con fosfato sin calcio ni magnesio.

5 Endotelización de constructos de proteínas de la matriz extracelular: Los constructos de proteínas de la matriz extracelular canina se sembraron con células endoteliales autólogas (CE) in vitro antes de la implantación. Los segmentos de arteria femoral, arteria carótida o vena cefálica canina (3-4 cm) se cultivaron en placas recubiertas con fibronectina en DMEM con contenido bajo de glucosa con FBS al 10 %, suplemento de crecimiento microvascular 1x, 125 ug/ml de heparina y 500 U/ml de penicilina G, para el aislamiento de CE mediante excrecencia a partir de cada segmento. El aislamiento y la expansión de las CE requirió 21 ± 2 días, y la unión de las CE a los constructos de proteínas de la matriz extracelular y el preacondicionamiento al cizallamiento requirió 2 días adicionales. Para la fijación de las CE, los lúmenes del injerto se recubrieron con fibronectina (100 µg/ml), se sembraron con CE (750.000/ml) y se expusieron a 11 horas de rotación a 10 rotaciones por hora para fomentar la distribución uniforme de las CE. El preacondicionamiento al cizallamiento se realizó al aumentar la velocidad media del medio de cultivo perfundido de manera gradual (10 etapas en total) durante un período de 22 horas, y mantener la velocidad media máxima (10-15 cm/s) para que coincida con la velocidad media informada para las arterias periféricas caninas (10-16 cm/s (Pedley, The Fluid Mechanics of Large Blood Vessels (Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido, 1980)) durante 13 horas antes del implante.

20 Análisis In Vitro: Las resistencias de retención de la sutura se midieron al pasar un asa de sutura Prolene 6-0 (aguja BV-1) a través de cada constructo de proteínas de la matriz extracelular, 2 mm desde el borde, y al suspender los pesos en incrementos de 10 g en el asa de sutura hasta que la sutura se empuja fuera del tejido. La resistencia de sutura se definió como el peso en gramos requerido para desgarrar el tejido. Las resistencias de sutura de los constructos de proteínas de la matriz extracelular se midieron antes del implante y después del explante en babuino. Las presiones de ruptura se midieron antes del implante al inflar los constructos de proteínas de la matriz extracelular humana de 6 mm, o constructos de proteínas de la matriz extracelular canina de 3-4 mm, con solución salina a temperatura ambiente hasta la ruptura, como se describió anteriormente (Dahl, y otros, Cell Transplantation 12, 659-666 (2003)). La presión de estallido se definió como la presión de inflado a la cual se rompió un constructo de proteína de la matriz extracelular.

30 Para la cuantificación de ADN, los segmentos de constructo de proteínas de la matriz extracelular se digirieron con papaína seguida de purificación de ADN mediante el uso de una columna de centrifugación basada en sílice Qiagen modificada. El ADN capturado resultante se eluyó mediante el uso de un tampón compatible de detección, y el ADN se cuantificó mediante el uso de un ensayo PicoGreen. La hidroxiprolina se midió en muestras digeridas con papaína, mediante el uso de cloramina T y p-dimetilaminobenzaldehído, y el colágeno se calculó como 10 veces la cantidad de hidroxiprolina

35 Modelos animales: Se eligió un modelo de primate del viejo mundo para proporcionar una similitud filogenética a los humanos, lo que permitió la implantación de injertos que contenían matriz humana no reticulada sin inmunosupresión. Los babuinos machos adultos (Papio Anubis, 20-30 kg) son físicamente lo suficientemente grandes como para soportar la implantación de un constructo de proteínas de la matriz extracelular de 6 mm de diámetro en un contexto anatómico relevante clínicamente. Los primates, sin embargo, son más caros significativamente que otros animales (Rashid, y otros, Biomaterials 25, 1627-1637 (2004)), son difíciles de manejar y mantener (Narayanaswamy, y otros, J Vasc Intervent Radiol 11, 5-17 (2000)), y su disponibilidad es limitada. Por lo tanto, los babuinos se usaron para estudios arteriovenosos, mientras que se usaron perros para investigaciones de diámetro pequeño.

45 Se empleó el modelo canino (perros mestizos de clase A, ~25 kg) para la evaluación de constructos de proteínas de la matriz extracelular de 3-4 mm de diámetro debido a su amplia aceptación en la comunidad científica para la evaluación de prótesis vasculares (Tomizawa, y otros, Circulation 90 (part2), II-160-II-166 (1994); Bianco, y otros, Large Animal Models in Cardiac and Vascular Biomaterials Research and Testing. B. D. Ratner, F. J. Schoen, A. S. Hoffman, J. E. Lemons, Eds., Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine (Elsevier Science & Technology Books, 2004)). El estudio canino usó un constructo de proteínas de la matriz extracelular acelular alogénica, sembrado con CE autólogas, que imita el enfoque propuesto para un eventual uso clínico de pequeño diámetro

50 Técnicas de Implantación Quirúrgica: Nueve babuinos machos adultos se sometieron a una colocación arteriovenosa de constructos de proteínas de la matriz extracelular humana (6 mm de DI). Un constructo de proteínas de la matriz extracelular se colocó en la posición aortocaval durante un mes. Se colocaron ocho constructos de proteínas de la matriz extracelular entre la arteria axilar y la vena braquial distal, lo que proporcionó un sitio superficial susceptible de simular el acceso a la hemodiálisis, durante hasta seis meses. Todas las anastomosis se crearon con una técnica de sutura Prolene 6-0.

60 Para probar la permeabilidad in vivo a largo plazo, se implantaron constructos de proteínas de la matriz extracelular canina (3-4 mm de DI) sembradas con CE autólogas de extremo a lado en la arteria carótida en cinco perros mediante el uso de sutura Prolene 8-0. La arteria carótida nativa intermedia se ocluyó con grapas quirúrgicas.

65 Se implantaron constructos de proteínas de la matriz extracelular canina (3-4 mm de DI) sembradas con CE autólogas en la circulación coronaria de tres perros. Una toracotomía izquierda expuso el corazón. Se usó derivación cardiopulmonar normotérmica y se logró un paro cardíaco con cardioplejía fría. Cada constructo de proteínas de la matriz extracelular se suturó a la arteria coronaria descendente anterior izquierda (Prolene 8-0) y a la aorta ascendente (aortotomía 4,0 mm,

Prolene 7-0), con ligadura de la arteria coronaria proximal. Después de la derivación coronaria, los animales se separaron de la derivación cardiopulmonar y se recuperaron.

5 Evaluaciones Inmunológicas: En el modelo xenogénico concordante de constructos derivados de células humanas implantados en babuinos, se evaluó la inmunogenicidad de constructos que contienen matriz humana. Se administraron inyecciones subcutáneas de constructos de proteínas de la matriz extracelular homogeneizadas (0,1 ml de una solución salina tamponada con fosfato de 0,25 mg de proteína/ml, PBS) y control negativo de PBS (0,1 ml) en los días 0 y 28, con evaluaciones visuales 48-72 horas después de cada inyección para detectar si se formaba una respuesta inmunitaria adaptativa in vivo.

10 Además, la proliferación de células T se midió a las 0, 4, 12 y 24 semanas para los implantes de babuinos. Los linfocitos se aislaron con un gradiente de Ficoll, y se cultivaron 7 días en placas de 96 pocillos con segmentos (5 mm x 5 mm) de constructo de proteínas de la matriz extracelular o injertos de PTFE como controles negativos, en cada pocillo. El medio de cultivo fue RPMI 1640 con suero bovino fetal al 10 %. Se añadió BrdU (100  $\mu$ M) a cada pocillo 18 horas antes de la recolección de células. Las células recolectadas se tiñeron con 200  $\mu$ l de colorante vivo/muerto diluido (Invitrogen L23102) durante 30 minutos a temperatura ambiente y después con 80  $\mu$ l de anticuerpo CD3-APC (BD 557597) durante 50 minutos a temperatura ambiente, se lavaron, se permeabilizaron (tampón 1x Cytotfix/Cytoperm y 1x Cytoperm Plus; BD), y se incubaron con 100  $\mu$ l de ADNasa para digerir parcialmente el ADN. Las células en proliferación se tiñeron con 50  $\mu$ l de anticuerpo BrdU-FITC (BD 559619) durante 20 minutos a temperatura ambiente y se suspendieron en 150  $\mu$ l de BSA al 0,2 %/DPBS para el análisis de citometría de flujo (Accura C6). Para el análisis de los datos, se seleccionaron células individuales y las células muertas se eliminaron del análisis. La tasa de proliferación se calculó como el porcentaje de células CD3+/BrdU+ en células CD3+.

25 Ultrasonido doble: En el modelo de babuino, se usó el ultrasonido doble para monitorear el diámetro, el grosor de la pared y la tasa de flujo del constructo de proteínas de la matriz extracelular del injerto medio inmediatamente después de la cirugía, y a las 2, 4, 12 y 24 semanas.

30 Angiografía: Se usó la angiografía para evaluar la dilatación y el estrechamiento del injerto. La permeabilidad del injerto se definió de acuerdo con la clasificación de Fitzgibbon (Fitzgibbon, y otros, J Am Coll Cardiol 28, 616-626 (1996)).

35 Se accedió directamente a todos los injertos de babuinos colocados desde la arteria axilar a la vena braquial en secciones de injerto medio o distal (aguja 16G, catéteres 5-6F) en los puntos temporales de 1, 3 y 6 meses (ver la Tabla 6) para determinar la capacidad de los constructos de proteínas de la matriz extracelular para soportar la punción como modelo para el acceso a hemodiálisis.

La angiografía de constructos caninos se realizó mediante un abordaje arterial femoral percutáneo a las 1, 4, 12, 26 y 52 semanas después del implante.

40 Angiografía por tomografía computarizada: Se realizó angiografía por tomografía computarizada (64 cortes; General Electric, Lightspeed VCT) de injertos de derivación coronaria. Los bloqueadores  $\beta$  intravenosos minimizaron el movimiento cardiaco, y se usó iohexol (350 mg/ml) como contraste. Se usaron cortes (0,625 mm de grosor) y un algoritmo de reconstrucción de tejidos blandos para evaluar el diámetro interno y el área de sección transversal de los injertos.

45 Histología: Los tejidos se fijaron en formalina tamponada neutra al 10 %, se incluyeron en parafina, se cortaron (secciones de 5  $\mu$ m) y se tiñeron con H-E, Movat o Rojo Alizarina S con una contratinción verde claro. Las secciones de tejido se prepararon, además, para el crioseccionamiento mediante deshidratación (sacarosa al 30 % en solución salina tamponada con fosfato) y congelación en un compuesto de temperatura óptima de corte (OCT). La inmunotinción se realizó en secciones de babuinos congeladas y secciones de canino fijadas en formalina para actina  $\alpha$  del músculo liso (SMC y marcador de miofibroblastos; explantes de babuinos: Dako M0851, dilución 1:50; explantes de caninos: Sigma A2547, dilución 1:5.000), factor von Willebrand (proteína sintetizada por CE; explantes de babuino: Dako M0616, dilución 1:25; explantes caninos: no teñidos), CD3 (parte del complejo receptor de células T en linfocitos T maduros; Abcam ab699, dilución 1:25) CD20 (proteína expresada en la superficie de células B maduras; Abcam ab9475, dilución 1:25), tipos de colágeno I y III (Novus NB600-1408 y NB600-594, dilución 1:200 para ambos), fibronectina (Novus NB110-1635, dilución 1:50) y vitronectina (Novus NB 110-57649, dilución 1:200) con tinción fluorescente o de 3,3'-diaminobenzidina (DAB). Las secciones teñidas con alizarina se evaluaron para confirmar la ausencia de calcificación (7  $\pm$  1 secciones/animal, n=11 animales). La inmunogenicidad se evaluó adicionalmente mediante la observación de secciones teñidas con H-E (11  $\pm$  2 secciones/animal, n=12 animales) y la inmunotinción para CD3 y CD20 (3  $\pm$  1 secciones/animal, n=2 animales). Los grososores neointimales de los vasos nativos en las anastomosis se calcularon como el área total de la célula tenía una pendiente diferente significativamente de 0. Los valores de P bilaterales menores de 0,05 indicaron significancia estadística. Los

65 Análisis Estadístico: Los análisis estadísticos se realizaron con una prueba t de Student de dos muestras, se asumieron varianzas desiguales, para los análisis con dos grupos. Se usó ANOVA de una vía para determinar diferencias significativas entre tres o más grupos, con la comparación post-hoc de Tukey. Se realizó una regresión lineal para evaluar si la resistencia de la sutura del constructo representada en función de la edad del donante de la célula tenía una pendiente diferente significativamente de 0. Los valores de P bilaterales menores de 0,05 indicaron significancia estadística. Los

valores numéricos se presentan como la media +/- error estándar de la media. La 'n' informada representa el número de constructos de cultivo individuales probados (segmentos no repetidos del mismo injerto), y se informa entre paréntesis en las tablas

### 5 Ejemplo 3

Generación de constructos de proteínas de la matriz extracelular a partir de células alogénicas y descelularización: Para producir constructos de proteínas de la matriz extracelular (3-6 mm de diámetro), se cultivan células alogénicas de músculo liso (SMC) obtenidas de donantes cadavéricos en armazones tubulares de ácido poliglicólico (PGA) rápidamente degradables en un bioreactor que administra una deformación radial cíclica (Niklason, y otros, Science 284, 489-493 (1999)). Durante el período de cultivo, las SMC secretan proteínas de la matriz extracelular, predominantemente colágeno, para formar tejido vascular biosintético (Niklason, y otros, Science 284, 489-493 (1999)), y el PGA se degrada. Al final del período de cultivo, el tejido resultante se descelulariza con detergentes, lo que deja solo la matriz de colágeno secretada (Dahl, y otros, Cell Transplantation 12, 659-666 (2003)). El proceso de descelularización destruye las células y elimina las células alogénicas antigénicas del constructo, lo que permite de esta manera el uso de células alogénicas agrupadas para producir constructos de proteínas de la matriz extracelular que no son inmunogénicos y pueden usarse en cualquier receptor. Estos constructos de proteínas de la matriz extracelular pueden almacenarse en una solución salina tamponada con fosfato estándar a 4 °C y están disponibles de inmediato para la creación de acceso arteriovenoso (6 mm de diámetro), o para sembrar con CE autólogas para reducir el riesgo de trombosis asociada con injertos vasculares de diámetro pequeño en contextos periféricos o coronarios (diámetros de injerto de 3-4 mm) (McAllister, y otros, Lancet 373, 1440-1446 (2009); Kaushal, y otros, Nat Med 7, 1035-1040 (2001); Zilla, y otros, Semin Vasc Surg 12, 52-63 (1999)).

### Ejemplo 4

Resistencia y estabilidad de constructos de proteínas de la matriz extracelular humana descelularizados: Se produjeron treinta y siete constructos de proteínas de la matriz extracelular descelularizados (6 mm de diámetro, 23 cm de longitud) mediante el uso de células de 19 donantes humanos, para evaluar la consistencia mecánica de constructos producidos a partir de diferentes donantes (Tabla 2). La resistencia de la sutura se midió mediante el uso de 2 mm de Prolene 6-0 desde el borde de cada constructo. La presión de estallido se probó de forma intermitente en constructos seleccionados al azar al inflar 2 cm de constructo tubular con solución salina hasta la ruptura. Las resistencias de la sutura (Tabla 2) no cambiaron significativamente con la edad del donante ( $P=0,26$ ; edades de 17 a 49), con origen de donante masculino frente a femenino ( $P=0,52$ ), o con el uso de donantes únicos frente a poblaciones de donantes combinadas (2-6 donantes por grupo) para el cultivo del injerto ( $P=0,42$ ). Un grupo de constructos de proteínas de la matriz extracelular se seleccionaron al azar y se almacenaron durante 12 meses. Los constructos de proteínas de la matriz extracelular conservaron su resistencia, sin cambios significativos en la resistencia de la sutura, la presión de estallido o la distensibilidad ( $P=0,97$ ,  $P=0,18$  y  $P=0,48$ , respectivamente) después de 12 meses de almacenamiento a 4 °C en solución salina tamponada con fosfato, y estuvieron dentro de los intervalos informados para la vasculatura humana nativa (Tabla 3). Los constructos de proteínas de la matriz extracelular contenían fragmentos de PGA residuales ( $1,1 \pm 0,1$  % del área de sección transversal de los constructos de proteínas de la matriz extracelular antes de su almacenamiento), que no se degradaron más durante el almacenamiento a 4 °C ( $1,0 \pm 0,1$  % después de 9 meses de almacenamiento,  $p=0,54$ ).

La Tabla 2 muestra los datos del donante y la resistencia de la sutura para constructos de proteínas de la matriz extracelular humana descelularizados de 6 mm de diámetro. Todos los datos se presentan como Media $\pm$ SEM (número de injertos diferentes analizados).

Tabla 2

Donante Humano	Edad del donante	Sexo del donante	Diabético	Fumador	Hipertensión	Otras enfermedades	Resistencia de la sutura g
1	17	F	No	No	No	Prolapso de la válvula mitral; Asma	250 (1)
2	19	M	No	No	No	Ninguna	233 $\pm$ 20 (4)
3	25	F	No	No	No	Ninguna	130 $\pm$ 20 (2)
4	33	F	No	No	No	Ninguna	80 (1)
5	34	F	No	Sí	No	Ninguna	223 $\pm$ 27 (4)
6	45	F	No	Sí	Sí	Asma	120 $\pm$ 10 (2)

5	7	46	M	No	Sí	Sí	Ninguna	110 (1)
	8	46	M	Sí	Sí	No	Ninguna	115 ± 5 (2)
	9	46	M	Sí	Sí	Sí	Fallo renal	135 ± 35 (2)
10	10	47	M	No	No	No	Enfermedad de reflujo gastroesofágico	275 ± 42 (4)
	11	47	M	No	Sí	No	Ninguna	120 ± 30 (2)
15	Combinación de donantes 9 y 12	46	M	Sí	Sí	Sí	Fallo renal	155 ± 35 (2)
		43	M	No	Sí	Sí	Ninguna	
20	Combinación de donantes 1, 4, 5, 7, 8 y 10	17	F	No	No	No	Prolapso de la válvula mitral; Asma	140 (1)
		33	F	No	No	No	Ninguna	
		34	F	No	Sí	No	Ninguna	
		46	M	No	Sí	Sí	Ninguna	
25		46	M	Sí	Sí	No	Ninguna	
		47	M	No	No	No	Enfermedad de reflujo gastroesofágico	
30	Combinación de donantes 13, 14 y 15	18	M	No	No	No	Ninguna	146 ± 5 (7)
		27	F	No	No	No	Ninguna	
		43	M	No	No	Sí	Herpes	
35	Combinación de donantes 16, 17, 18 y 19	17	F	No	No	No	Ninguna	265 ± 25 (2)
		27	M	No	Sí	No	Ninguna	
		47	M	No	Sí	Sí	Artritis	
40		49	F	No	Sí	No	Ninguna	

La Tabla 3 muestra las propiedades mecánicas de los constructos de proteínas de la matriz extracelular antes y después de 12 meses de almacenamiento, y los comparadores nativos.

Tabla 3

	Resistencia de la sutura g	Presión de estallido mm Hg	% de Distensibilidad por 100 mm Hg
50	Constructos humanos de 6 mm de diámetro	178 ± 11 (37)	3.337 ± 343 (10)
	Constructos humanos de 6 mm de diámetro almacenados 12 meses	170 ± 22 (9)	2.651 ± 329 (5)
55	Vena safena humana	196 ± 29 (7)	1.599 ± 877 (7)
	Arteria mamaria interna humana	138 ± 50 (6)	3.196 ± 1.264 (16)

La Tabla 4 muestra el grosor mínimo y máximo de la pared y la Tabla 5 muestra el contenido de beta-actina, lípidos e hidroxiprolina de los constructos de proteínas de la matriz extracelular descelularizados de la presente invención en comparación con constructos de base celular o tejido nativo fresco.

Tabla 4

Grosor mínimo de la pared (um)	Grosor máximo de la pared (um)	Beta Actina (ng/cm de longitud del injerto)	Lípido (% en peso seco)	Hidroxirolina (mg/g de peso seco)
391 ± 22 (23)	586 ± 33 (23)	41 ± 4 (22)	1,1 ± 0,1 (23)	60 ± 2 (14)

Informes previos sobre tejidos obtenidos por ingeniería a partir de células humanas han producido resistencias de sutura más bajas significativamente (59 g), presiones de ruptura más bajas significativamente (59-108 mm Hg), grosores de pared promedio más bajos significativamente (181 micrómetros) y un contenido de hidroxirolina más bajo significativamente (5-16 mg/g peso seco) (Poh, y otros, Lancet 365, 2122-2124 (2005); McKee, y otros, EMBO Rep 4, 633-638 (2003)). Esta superioridad de los constructos actuales en comparación con los de Poh y otros puede deberse al uso de células humanas de pase inferior, así como también a la composición del medio específico que se usó durante el cultivo del biorreactor, las cuales pueden haber contribuido a un crecimiento celular superior, producción de matriz de colágeno, y por lo tanto propiedades mecánicas mejoradas.

Tabla 5

	Beta Actina (ng/cm de longitud del injerto)	Lípido (% en peso seco)
Fresco	1.958 ± 479 (7)	1,9 ± 0,2 (6)
Descelularizado	41 ± 4 (22)	1,1 ± 0,1 (23)

Los constructos de la presente invención no presentan células vivas. Los contenidos de beta-actina y lípidos se reducen mediante la descclularización. En contraste, un enfoque de desvitalización que destruye las células, pero no elimina los restos celulares, retiene probablemente concentraciones de beta-actina y lípidos que semejan las concentraciones de un tejido fresco.

## Ejemplo 5

Constructos de proteínas de la matriz extracelular humana descclularizados en un modelo arteriovenoso: Para evaluar el desempeño de los constructos de proteínas de la matriz extracelular de 6 mm, se implantaron nueve constructos de proteínas de la matriz extracelular cultivados a partir de células humanas (6 mm de diámetro, 12,5 ± 1,1 cm de longitud) en babuinos como conductos arteriovenosos (Figura 2A) y se observaron durante 1-6 meses (Tabla 6). Se excluyó a un animal después de que abriera el sitio de la incisión quirúrgica, lo que expuso el constructo y creó una infección en la herida. No se observó infección en los 8 animales restantes. Las mediciones de ultrasonido doble de constructos de proteínas de la matriz extracelular en las semanas 0, 2, 4, 12 y 24 (Tabla 7) no mostraron cambios en el diámetro (P=0,28), ningún cambio en el grosor de la pared (P=0,93) y un aumento en la tasa de flujo entre las semanas 0 y 2 (P<0,01). El flujo a través de constructos de proteínas de la matriz extracelular (Tabla 7) fue suficiente para la hemodiálisis (> 300 ml/min (B. Dixon, Kidney Int 70, 1413-1422 (2006))). Los constructos de proteínas de la matriz extracelular se accedieron inicialmente a las 4 semanas (Figura 2B), que es un momento relevante clínicamente para el primer acceso para permitir la integración y remodelación de los injertos de hemodiálisis, y después a los 3 y 6 meses. De las ocho constructos de proteínas de la matriz extracelular arteriovenosos, 2/2 fueron patentes a 1 mes, 2/3 fueron patentes al explante de 3 meses y 3/3 fueron patentes al explante de 6 meses (Figura 2C). Solo un constructo mostró trombosis a los 3 meses, debido probablemente a dificultades técnicas con el acceso, lo que requirió una presión manual prolongada que llevó a la coagulación. Por lo tanto, la permeabilidad de los constructos de proteínas de la matriz extracelular arteriovenosa de 6 mm en el babuino fue del 88 % (7/8). No se observó dilatación aneurismática ni calcificación en ningún constructo. Además, los constructos no mostraron hiperplasia de la íntima sustancial. La hiperplasia de la neointima anastomótica a los 6 meses (hiperplasia luminal con un grosor de 0,11 ± 0,05 mm) fue menor que la informada a 1 mes para los injertos de derivación arterial con PTFE en un modelo de babuino (0,25±0,09 mm) (Lumsden, y otros, J Vase Surg 24, 825-833 (1996)).

La hiperplasia de la íntima venosa es mínima a los 3 meses para constructos de proteínas de la matriz extracelular en un modelo de babuino. La anastomosis venosa de un constructo de proteínas de la matriz extracelular se muestra en la Figura 8a, con el constructo (G) a la izquierda y la vena (V) a la derecha. Sólo se ven pequeños parches de hiperplasia de la íntima en la vena, y estos parches están circulados. Por el contrario, la Figura 8b muestra que la vena adyacente a un injerto de PTFE tiene una hiperplasia de la íntima más grande sustancialmente (ver la región en círculo como un ejemplo del grosor de la hiperplasia de la íntima) en un humano. Además, el grado de hiperplasia de la íntima en la sección de injerto también es mínima para el constructo de proteínas de la matriz extracelular y sustancial para el injerto de PTFE (Prichard y otros, An early study on the mechanisms that allow tissue-engineered vascular grafts to resist intimal hiperplasia. J Cardiovasc Transl Res 4 (5):674-682, 2011).

La Tabla 6 muestra un resumen de constructos de proteínas de la matriz extracelular implantados.

Tabla 6

	Diámetro interno del injerto (mm)	Sembrado de CE autólogas	Puntos temporales de acceso al injerto (Meses)	Dilatación de Aneurisma	Patente
Constructos humanos en un modelo arteriovenoso en babuino					
1 Mes	6	No	Sin Acceso	No	Sí
1 Mes	6	No	1	No	Sí
3 Meses	6	No	1	No	No
3 Meses	6	No	1,3	No	Sí
3 Meses	6	No	1,3	No	Sí
6 Meses	6	No	1,3,6	No	Sí
6 Meses	6	No	1, 3, 6	No	Sí
6 Meses	6	No	1, 3, 6	No	Sí
Excluido	6	No	Excluido	Excluido	Excluido
Constructos caninos en un modelo de derivación de arteria carótida en canino					
1 Semana	3	Sí	NA	No	No
1 Mes	3	Sí	NA	No	Sí
12 Meses	3	Sí	NA	No	Sí
12 Meses	4	Sí	NA	No	Sí
Excluido	3	Sí	Excluido	Excluido	Excluido
Constructos caninos en un modelo de derivación coronaria en canino					
1 Semana	3	Sí	NA	No	Sí
1 Mes	3	Sí	NA	No	Sí
Excluido	3	Sí	Excluido	Excluido	Excluido

La Tabla 7 muestra las mediciones de ultrasonido doble de constructos de proteínas de la matriz extracelular colocados como injertos arteriovenosos en babuinos.

Tabla 7

	Semana 0	Semana 2	Semana 4	Semana 12	Semana 24
Diámetro (mm)	5,8 ± 0,2 (7)	6,3 ± 0,3 (7)	6,7 ± 0,3 (7)	6,8 ± 0,6 (5)	6,3 ± 0,2 (3)
Grosor de la pared (mm)	1,0 ± 0,1 (7)	0,9 ± 0,1 (7)	1,0 ± 0,1 (7)	1,1 ± 0,2 (5)	1,0 ± 0,1 (3)
Tasa de flujo (ml/min)	764 ± 216 (7)	2.278 ± 430 (7)	1.464 ± 124 (7)	1.559 ± 379 (5)	1.572 ± 301 (3)

Ejemplo 6

Constructos de proteínas de la matriz extracelular en modelos de derivación arterial periférica y coronaria de diámetro pequeño: El desempeño de los constructos de proteínas de la matriz extracelular de diámetro pequeño (3-4 mm) se evaluó en modelos caninos de derivación arterial periférica y coronaria. Los constructos de proteínas de la matriz extracelular

canina se produjeron a partir de células caninas alogénicas, se descelularizaron y se sembraron luminalmente con CE autólogas del receptor deseado. Las CE adjuntas se alargaron y alinearon dentro de los lúmenes de los constructos de proteínas de la matriz extracelular, pero nunca se logró una cobertura completa de CE. Más bien, la cobertura de CE varió ampliamente entre constructos, con un intervalo de cobertura de 0-60 % ( $14 \pm 8$  %) en secciones muestreadas de constructos antes del implante. Generalmente, los constructos caninos fueron menos fuertes que los constructos humanos, aunque aún fueron adecuados para la implantación (las presiones de ruptura fueron de  $1.618 \pm 67$  mm Hg para injertos caninos de 3 mm;  $n=39$ ).

Se implantaron cinco constructos de proteínas de la matriz extracelular canina endotelializados (3-5 cm de longitud) como injertos de derivación de la arteria carótida, con tiempos de seguimiento de 1 semana a 12 meses (Figura 2D). Un animal se excluyó después de morir agudamente con un injerto patente. Un injerto se ocluyó 1 semana después. Todos los demás constructos permanecieron patentes, lo que incluye dos constructos que se siguieron durante un año (Tabla 6). Un angiograma representativo al año (Figura 2E) demostró una permeabilidad a largo plazo excelente. No se observó estenosis ni dilatación en los constructos implantados, y no se observó hiperplasia de la íntima en las anastomosis.

Además, se implantaron tres constructos de proteínas de la matriz extracelular canina endotelializados (7-10 cm de longitud) en la arteria coronaria descendente anterior izquierda de perros (Figura 2F) y se siguieron por hasta 1 mes (Tabla 6). Un animal murió el día después de la implantación con un constructo patente y se excluyó del estudio. Todos los constructos de derivación de arterias coronarias fueron patentes en explantes de 1 semana y 1 mes (Figura 2G). Para todos los constructos de proteínas de la matriz extracelular canina de diámetro pequeño (un total de 6 en las circulaciones carótida y coronaria), la permeabilidad primaria fue del 83 % (5/6)

#### Ejemplo 7

Remodelación de constructos de proteínas de la matriz extracelular in vivo: Antes del implante, los constructos de proteínas de la matriz extracelular eran suaves y uniformes (Figura 3A). La evaluación histológica (Figura 3B), así como también la cuantificación de ADN ( $0,74 \pm 0,10$   $\mu$ g de ADN/mg de peso de tejido seco), demostraron que el grado de descelularización de los constructos de proteínas de la matriz extracelular era similar a la de otros armazones descelularizados usados clínicamente (Derwin y otros, *J Bone Joint Surg Am* 88, 2665-2672 (2006)). La matriz extracelular de los constructos contenía los colágenos tipo I y III, que son los tipos más prevalentes en la vasculatura nativa, así como también la fibronectina y la vitronectina, todas con alineación principalmente circunferencial (Figura 3).

Después de la implantación en babuinos y caninos, los constructos de proteínas de la matriz extracelular mostraron una remodelación considerable. Para todos los injertos, el análisis macroscópico en el explante reveló una superficie interna lisa del tejido del injerto con la formación de una capa de tejido "adventicio" externo fibroso suelto (Figura 4A). Los constructos de proteínas de la matriz extracelular demostraron una falta notable de tejido fibrótico restrictivo que rodea los injertos en el explante (Figura 4A). Los constructos se integran bien con la vasculatura nativa en los sitios anastomóticos (Figura 4B).

Los constructos de proteínas de la matriz extracelular se remodelaron para que fueran más similares en composición a la arteria nativa después de la implantación. Dentro de los 3 meses posteriores al implante, se formó elastina en secciones anastomóticas de injertos explantados de babuinos (Figura 4C) en regiones que contienen la densidad más alta de células huésped infiltradas (Figura 4D). No se observó elastina en el injerto medio en ninguno de los constructos de proteínas de la matriz extracelular explantados. Las células positivas a actina alfa del músculo liso, que podrían ser SMC o miofibroblastos, poblaron densamente todo el grosor de los constructos de proteínas de la matriz extracelular cerca de los sitios anastomóticos (Figura 4E), lo que sugiere la migración a partir de la vasculatura nativa adyacente. Las células positivas a actina parecían infiltrarse transmuralmente desde la capa de tejido similar a adventicia hacia los constructos de proteínas de la matriz extracelular en las regiones del injerto medio, lo que comienza a los 6 meses en el modelo de babuino (Figura 4F).

En el modelo canino, las células positivas para actina  $\alpha$  del músculo liso comenzaron a infiltrarse transmuralmente en las secciones del injerto medio hacia 1 mes (Figura 4G) y se observaron en toda la pared del injerto medio hacia 1 año (Figura 4H). La infiltración de la célula huésped en las paredes del constructo de proteínas de la matriz extracelular del injerto medio fue más rápida en el modelo canino, posiblemente debido a que se colocaron injertos más cortos en los caninos o debido a diferencias en especies. En ambos modelos, había menos células dentro de las paredes del constructo de proteínas de la matriz extracelular en las secciones del injerto medio (Figura 4F, Figura G, Figura H) que en las secciones cerca de las anastomosis (Figura 4D, Figura E). Se observaron células positivas al factor de Von Willebrand (un marcador de CE) en las superficies lumbales de constructos de proteínas de la matriz extracelular, tanto cerca de los sitios anastomóticos y en el injerto medio tanto en los injertos caninos (que se endotelializaron antes de la implantación) como en los injertos en babuino (que no lo fueron) (Figura 4I). Las CE pueden haber migrado del tejido vascular anastomosado, migrar transmuralmente desde el tejido circundante (Zilla y otros, *Biomaterials* 28, 5009-5027 (2007)), u originarse a partir de células progenitoras circulantes (Asahara, y otros, *Science* 275, 964-967 (1997)).

En el estudio en babuinos, los segmentos de constructos de proteínas de la matriz extracelular de injerto medio se guardaron para pruebas mecánicas y análisis de colágeno en el explante. Los constructos de proteínas de la matriz extracelular explantados mostraron una mayor resistencia de sutura ( $276 \pm 28$  g,  $n=8$ ,  $P=0,01$ ), pero no cambios

significativos en la presión de estallido ( $3.646 \pm 582$  mm Hg,  $n=4$ ,  $P=0,67$ ) o distensibilidad ( $3,4 \pm 2,3$  % por 100 mm Hg,  $n=4$ ,  $P=0,70$ ) en comparación con los valores antes del implante que se informaron en la Tabla 3. Por lo tanto, los constructos de proteínas de la matriz extracelular fueron robustos mecánicamente sin una infiltración completa de las células en las secciones de injerto medio (Figura 4F) o elastina en las secciones de injerto medio. No se observaron cambios significativos en densidad de colágeno entre los constructos de proteínas de la matriz extracelular antes del implante ( $57 \pm 5$  %,  $n=8$ ), los constructos de proteínas de la matriz extracelular en el explante ( $46 \pm 5$  %,  $n=7$ ), la arteria axilar de entrada ( $46 \pm 5$  %,  $n=7$ ), o arteria axilar control explantada desde el brazo sin implante ( $42 \pm 3$  %,  $n=7$ ;  $P=0,07$ ).

Los constructos de proteínas de la matriz extracelular no fueron inmunogénicos. Las inyecciones de constructo de proteínas de la matriz extracelular homogeneizados y PBS como control negativo, se colocaron por vía intradérmica en cada babuino en el momento del implante del injerto y nuevamente 4 semanas después de la implantación (Figura 5A). La ausencia de endurecimiento visible o enrojecimiento en todos los sitios de inyección indicó que los receptores no se sensibilizaron al material de injerto. La inmunogenicidad de los injertos se evaluó, además, mediante el muestreo de sangre de babuinos con constructos de proteínas de la matriz extracelular implantados, y la medición de la proliferación in vitro de células T expuestas a injertos de PTFE (control negativo) o constructos de proteínas de la matriz extracelular (Figura 5B). La inmunotinción de las regiones celulares densas (Figura 5C) mostró solo poblaciones dispersas de células positivas para CD3 o CD20 (Figura 5D, Figura E), que a menudo no se detectaron en las secciones del injerto medio. No se observaron células gigantes de cuerpo extraño en ningún constructo de proteínas de la matriz extracelular explantado. Finalmente, la calcificación, que se observa comúnmente en injertos vasculares xenogénicos o que contienen elastina (Hilbert, y otros, *J. Biomed Mater Res A* 69, 197-204 (2004); Hopkins, y otros, *J Thorac Cardiovasc Surg* 137, 907-913, 913e901-904 (2009)), no se observó en ningún constructo de proteínas de la matriz extracelular en ningún modelo (Figura 5F).

#### Ejemplo 8

Los constructos de proteínas de la matriz extracelular se generaron mediante el cultivo de células de donante cadavérico humano o células caninas en una armazón de PGA degradable para soportar la síntesis de una matriz extracelular de colágeno. El material celular antigénico se eliminó mediante una etapa de descelularización basada en detergente para hacer a los tejidos no inmunogénicos. Los constructos de proteínas de la matriz extracelular contenían fragmentos de PGA mínimos y conservaban propiedades mecánicas similares a la de los vasos nativos después de 12 meses de almacenamiento en tampón a  $4$  °C. El desempeño de los constructos de proteínas de la matriz extracelular humana de 6 mm de diámetro se demostró en un modelo arteriovenoso de babuino. Los constructos de proteínas de la matriz extracelular canina de diámetro pequeño (3-4 mm) se sembraron luminalmente con CE, y se implantaron en modelos caninos de derivación periférica y coronaria. Los constructos de proteínas de la matriz extracelular se integraron bien con la vasculatura nativa en los sitios anastomóticos y resistieron la hiperplasia de la íntima. Se observó infiltración de células positivas a actina  $\alpha$  del músculo liso, CE en lúmenes de injerto y formación de elastina cerca de las anastomosis. La permeabilidad a largo plazo se demostró por hasta un año.

El enfoque del uso de células humanas alogénicas para producir constructos de proteínas de la matriz extracelular permite a un donante humano proporcionar injertos para docenas de pacientes (Figura 6). Este enfoque difiere significativamente del modelo un donante a un receptor, que corresponde a la ingeniería autóloga de tejidos y a los vasos sanguíneos de animales o de cadáveres de humanos. Un donante humano proporciona un banco de células lo suficientemente grande como para producir 37 constructos de proteínas de la matriz extracelular de diámetro grande (6 mm de diámetro interno) o 74 constructos de proteínas de la matriz extracelular de diámetro pequeño (3 mm de diámetro interno). La agrupación de células de múltiples donantes permite la generación de grandes bancos de células, lo que a su vez hace posible la fabricación de muchos constructos de proteínas de la matriz extracelular por banco de células (es decir, 200-500 unidades). Esto ofrece economías de escala mayores que los enfoques de ingeniería de tejidos completamente autólogos. Además, el uso de células alogénicas, combinado con métodos de descelularización y almacenamiento simple, permite que el período de cultivo para la producción de injertos se mueva "fuera de línea". Por lo tanto, los pacientes no tienen un período de espera para la producción de injertos ya que los injertos ya se han creado y almacenado. La capacidad de almacenar injertos es un etapa importante para hacer que los constructos de proteínas de la matriz extracelular estén disponibles para el paciente inmediatamente en el momento que lo necesita, a diferencia de los injertos personalizados para cada paciente. Este es un cambio importante con respecto a los productos que contienen células, que generalmente no pueden almacenarse a largo plazo sin un equipo especializado de criopreservación y procedimientos de descongelación laboriosos (Pascual, y otros, *Ann Vasc Surg* 15, 619-627 (2001)).

#### Ejemplo 9

Se usó un modelo porcino para evaluar el conducto para la desviación urinaria. Ambos uréteres se anastomosaron al conducto en modo Wallace. Se colocó una endoprótesis vascular para desviación urinaria en cada uréter para prevenir tanto la fuga anastomótica temprana como la estenosis, durante la fase postoperatoria normal de inflamación del uréter. Se extrajo un tapón de piel y tejido subcutáneo para acomodar el conducto. Se creó una incisión cruciforme en la fascia, se dividió el músculo, y se creó una incisión cruciforme en la vaina del recto posterior. Después, se llevó el conducto a través de la pared abdominal y se aseguró a la piel y al tejido subcutáneo con sutura. Se adhirió una barrera cutánea y una bolsa de ostomía a la piel que rodea el estoma para la recolección de orina. La tunelización en el plano retroperitoneal mantiene el injerto fuera de la cavidad abdominal, lo que minimiza el riesgo de formación de adherencias entre el injerto

5 y otros tejidos abdominales. Esto es importante porque la formación de adherencias es un problema clínico real. La tunelización del injerto en el plano retroperitoneal, las anastomosis con los uréteres, y la anastomosis con la piel en el sitio del estoma, proporcionan en conjunto la exposición a una fuente de vascularización, que puede ayudar en la resistencia a la infección. La exposición al peritoneo, la piel, los uréteres y la orina puede proporcionar, además, una fuente de células para poblar el conducto. Las Figura 9A-9E muestran el uso de los constructos de proteínas de la matriz extracelular de la presente invención como conductos urinarios. Los resultados muestran que los conductos toleran la exposición crónica a la orina. La orina humana concentrada se recolectó y se bombeó a través de un segmento del injerto del conducto urinario durante 4 semanas a 37 °C. Después de 4 semanas de circulación de orina, el injerto resistió la difusión activa de la orina a través de la pared del injerto. Esta falta de difusión significativa a través de la pared del conducto se demuestra por la observación de que la orina concentrada en la botella era más oscura que el líquido externo al injerto en el asa de flujo

10 (este líquido era solución salina tamponada con fosfato). Por el contrario, los conductos ileales, que son el material de injerto estándar de oro actual para desviaciones urinarias, absorben activamente sus contenidos.

15 La Tabla 8 muestra la resistencia de la sutura del conducto urinario antes y después de 4 semanas de exposición a la orina.

Tabla 8

	Resistencia al arranque de la sutura (g)
Injerto antes de la exposición a la orina	280 ± 35
Injerto en orina durante 4 semanas	275 ± 15

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un constructo que comprende una armazón tubular de ácido poliglicólico biodegradable no tejido, en donde la densidad del ácido poliglicólico es de 45 mg/cc a 75 mg/cc y dicha densidad es uniforme en toda la armazón tubular, en donde el grosor del ácido poliglicólico es de 0,8 a 1,2 mm y en donde el grosor de las fibras dentro del ácido poliglicólico es de 5 a 20  $\mu\text{m}$ .
- 10 2. El constructo de conformidad con la reivindicación 1, en donde la longitud de la armazón tubular de ácido poliglicólico biodegradable es de 1 cm a 100 cm.
3. El constructo de conformidad con la reivindicación 1, en donde el diámetro interior de la armazón tubular de ácido poliglicólico biodegradable es de 3 mm a 6 mm.
- 15 4. El constructo de conformidad con la reivindicación 1, que comprende además soportes de politereftalato de etileno no biodegradables en cada extremo de la armazón tubular de ácido poliglicólico biodegradable, en donde la porosidad del politereftalato de etileno es  $\geq 200 \text{ cc/min/cm}^2$  y los soportes permiten la unión y el crecimiento de células.
- 20 5. El constructo de conformidad con la reivindicación 1, en donde el constructo está libre sustancialmente de contaminantes de metales pesados.
- 25 6. El constructo de conformidad con la reivindicación 5, en donde el constructo comprende cantidades traza de contaminantes de metales pesados seleccionados del grupo que consiste en: aluminio, bario, calcio, yodo, lantano, magnesio, níquel, potasio y zinc.
- 30 7. El constructo de conformidad con la modalidad 1, en donde el constructo comprende además proteínas de la matriz extracelular.
8. El constructo de conformidad con la reivindicación 7, en donde el grosor de las proteínas de la matriz extracelular es mayor de aproximadamente 200 micrómetros en la porción más delgada de la matriz.
- 35 9. Un método para producir un constructo tubular de ácido poliglicólico que comprende:
  - (a) proporcionar una lámina de ácido poliglicólico biodegradable, en donde la densidad del ácido poliglicólico es de 45 mg/cc a 75 mg/cc y el grosor de la lámina de ácido poliglicólico es de 0,8 a 1,2 mm,
  - (b) envolver la lámina de ácido poliglicólico alrededor de un mandril de manera que los bordes opuestos de la lámina de ácido poliglicólico se encuentren en una interfaz;
  - (c) tirar de las fibras de ácido poliglicólico de cada borde opuesto de la lámina a través de la interfaz, y
  - (d) formar una costura al entrelazar dichas fibras de ácido poliglicólico estiradas desde un lado de la interfaz con las fibras de ácido poliglicólico en el lado opuesto de la interfaz, en donde la densidad del ácido poliglicólico en la costura es de 45 mg/cc a 75 mg/cc y el grosor del ácido poliglicólico en la costura es de 0,8 a 1,5 mm, lo que produce de esta manera un constructo tubular de ácido poliglicólico biodegradable con una densidad de ácido poliglicólico uniforme.
- 45 10. El método de conformidad con la reivindicación 9, que comprende además tratar el constructo tubular para eliminar los contaminantes de metales pesados.
11. El método de conformidad con la reivindicación 10, en donde la costura permanece intacta después de dicho tratamiento.
- 50 12. El método de conformidad con la reivindicación 9, que comprende además tratar el constructo tubular para aumentar la tasa de degradación del ácido poliglicólico.
13. El método de conformidad con la reivindicación 12, en donde la costura permanece intacta después de dicho tratamiento.
- 55 14. Un constructo tubular de ácido poliglicólico biodegradable formado mediante el método de conformidad con la reivindicación 9.

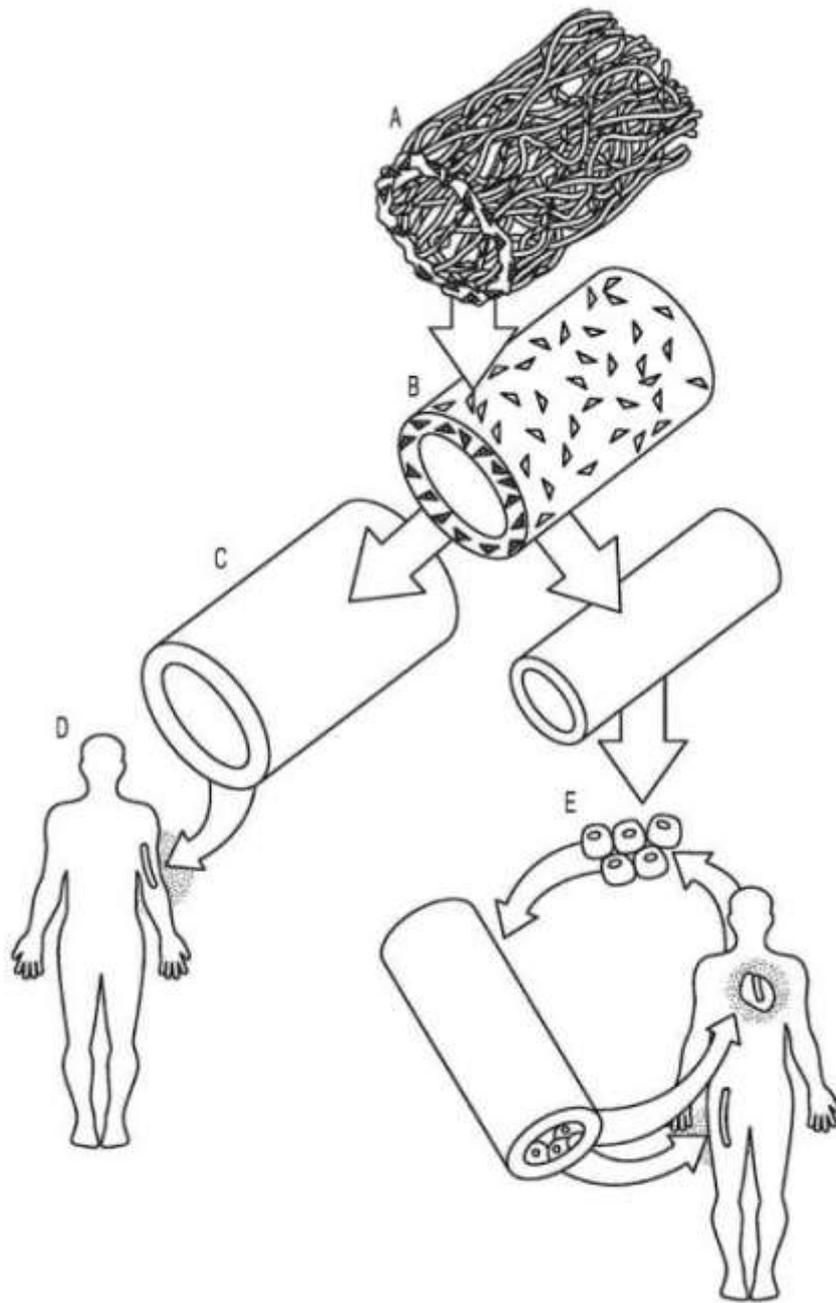


FIG. 1



FIG. 2A



FIG. 2B

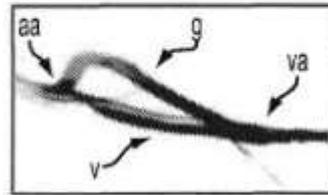


FIG. 2C

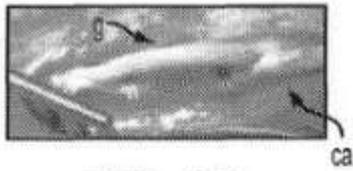


FIG. 2D



FIG. 2E

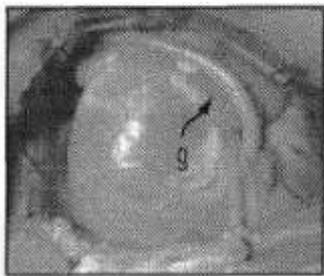


FIG. 2F

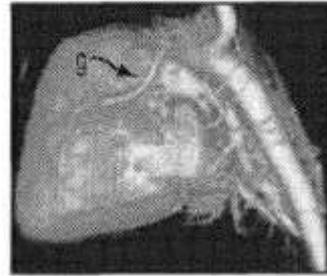


FIG. 2G

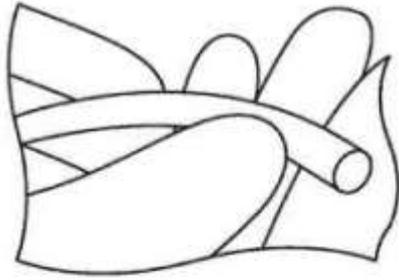


FIG. 3A

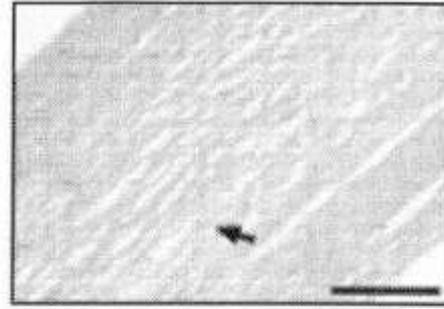


FIG. 3B

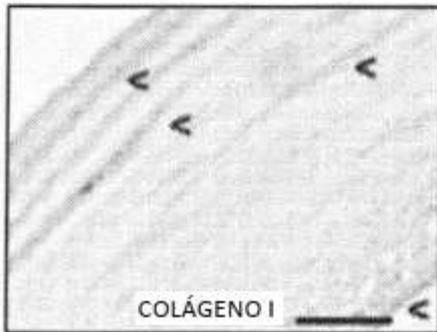


FIG. 3C

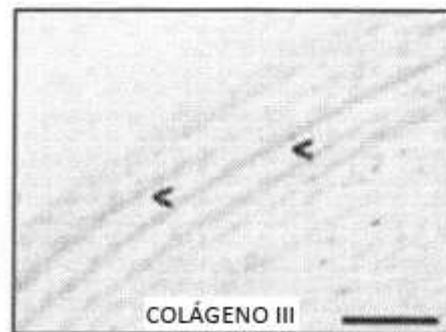


FIG. 3D

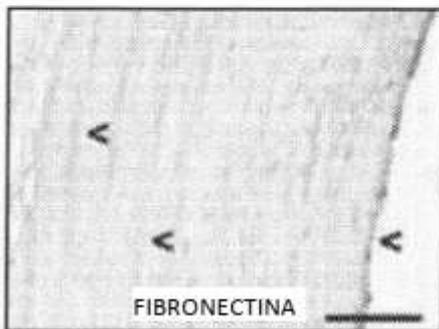


FIG. 3E

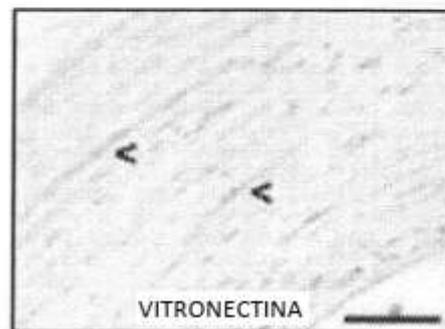


FIG. 3F

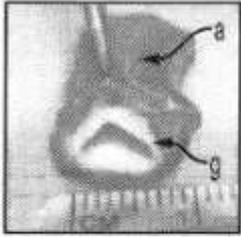


FIG. 4A



FIG. 4B



FIG. 4C

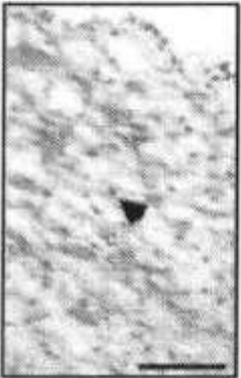


FIG. 4D

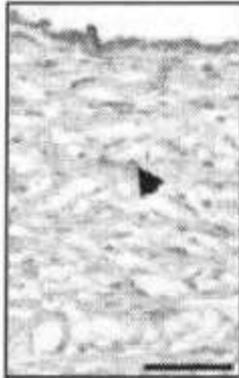


FIG. 4E



FIG. 4F

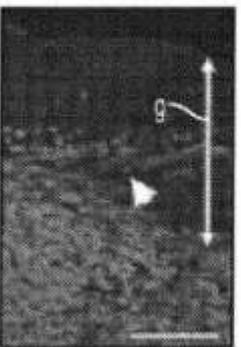


FIG. 4G

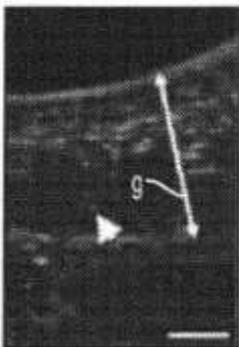


FIG. 4H



FIG. 4I

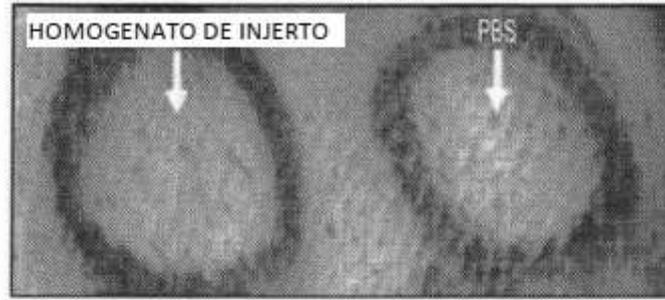


FIG. 5A

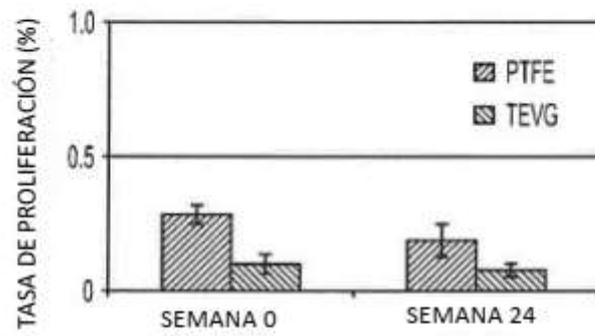


FIG. 5B



FIG. 5C



FIG. 5D

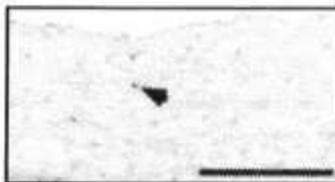


FIG. 5E



FIG. 5F

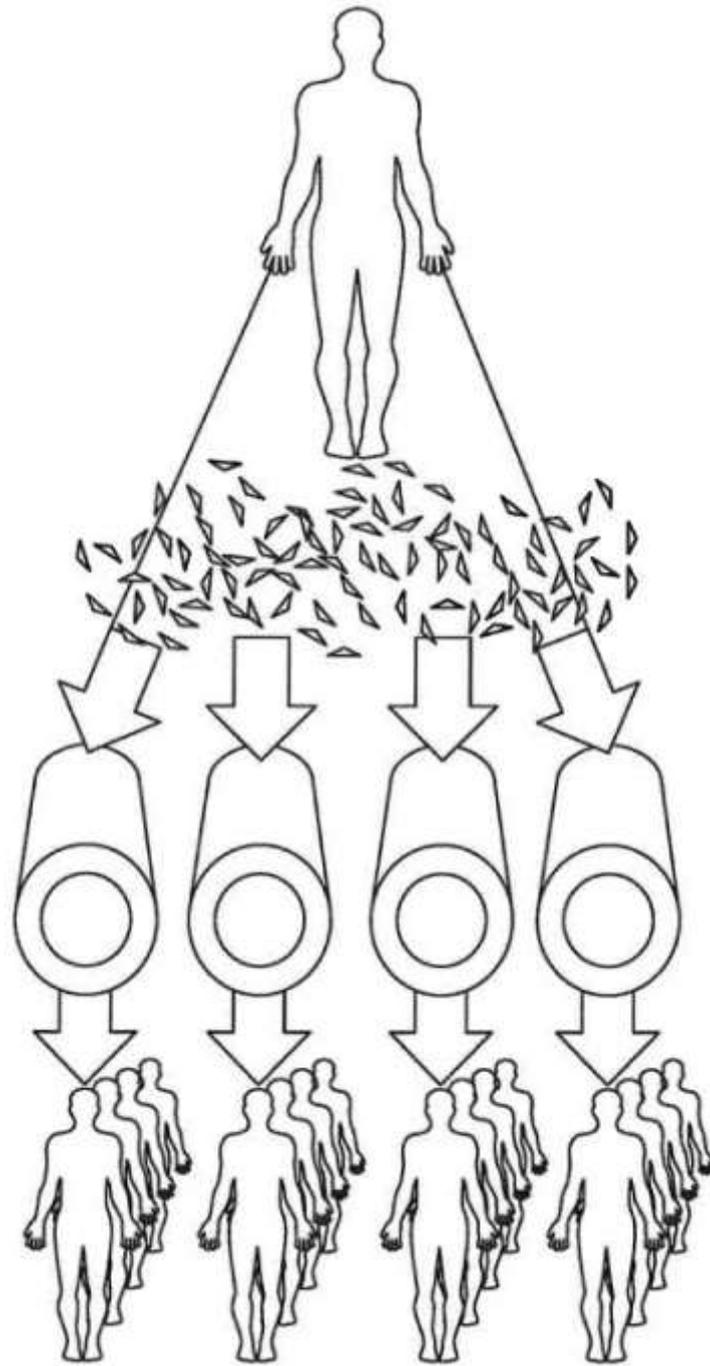


FIG. 6

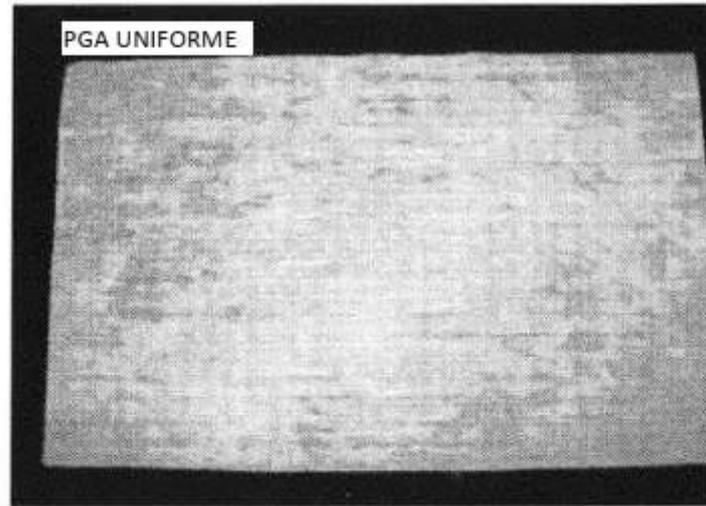


FIG. 7A

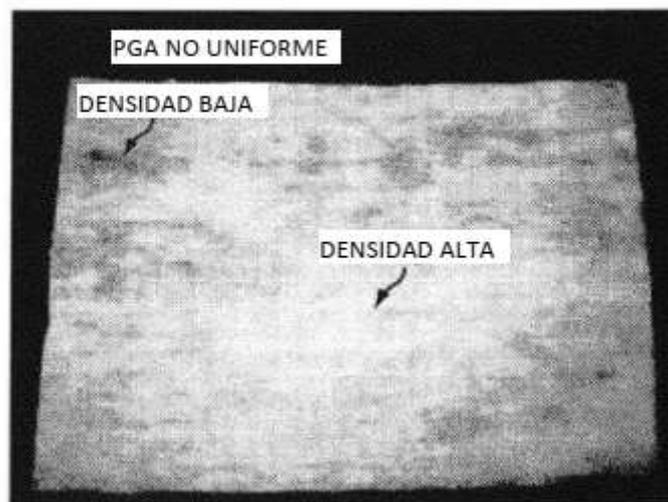


FIG. 7B

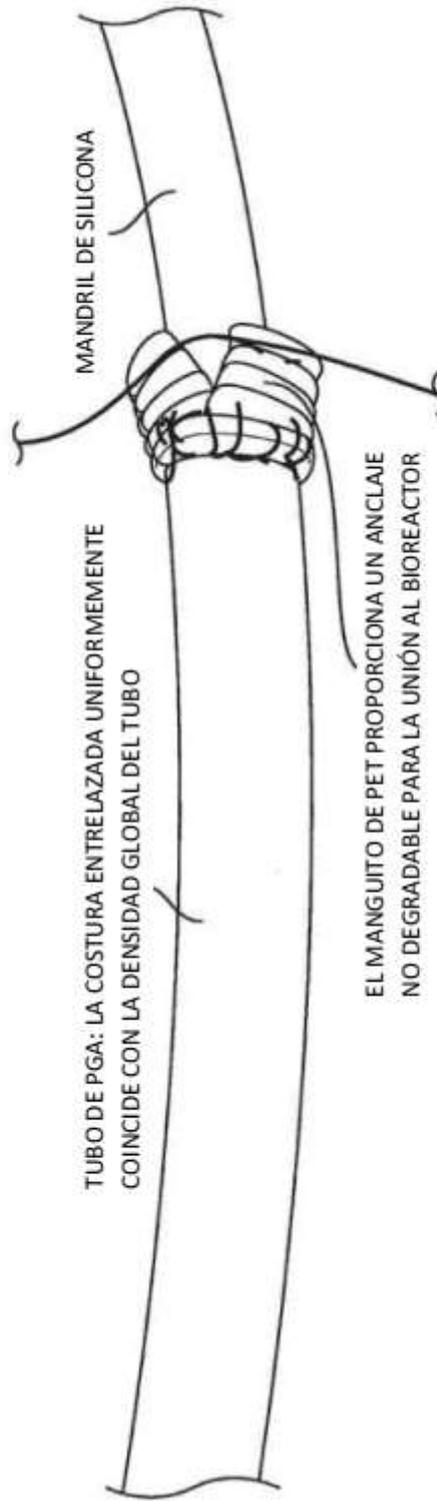


FIG. 7C

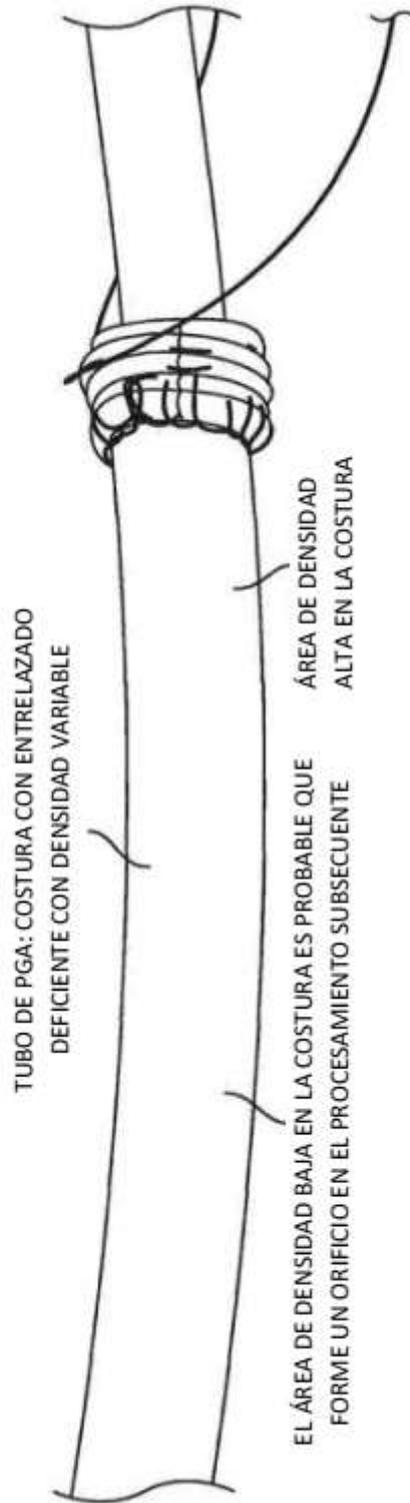


FIG. 7D

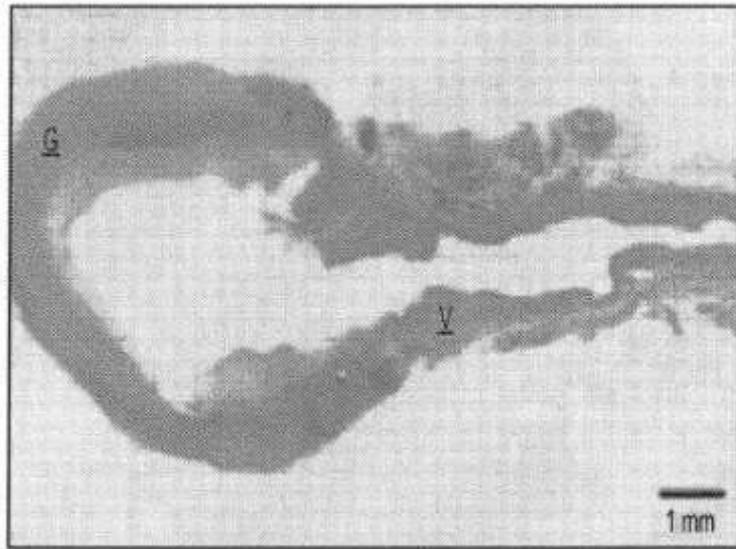


FIG. 8A

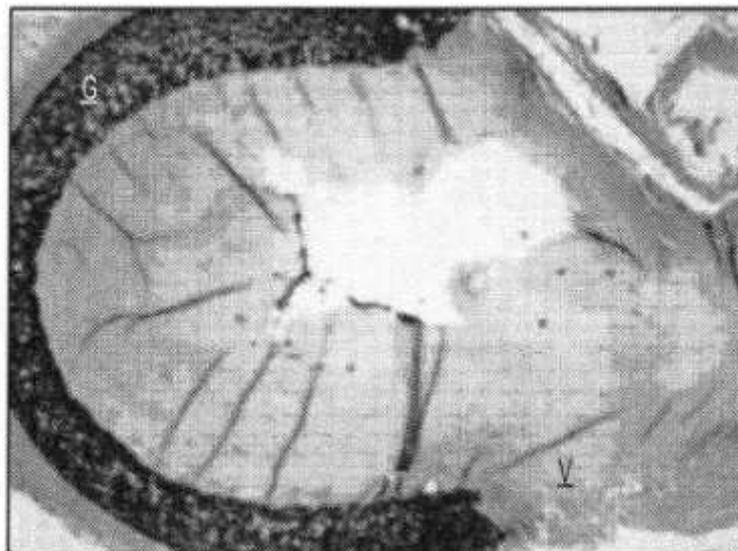


FIG. 8B

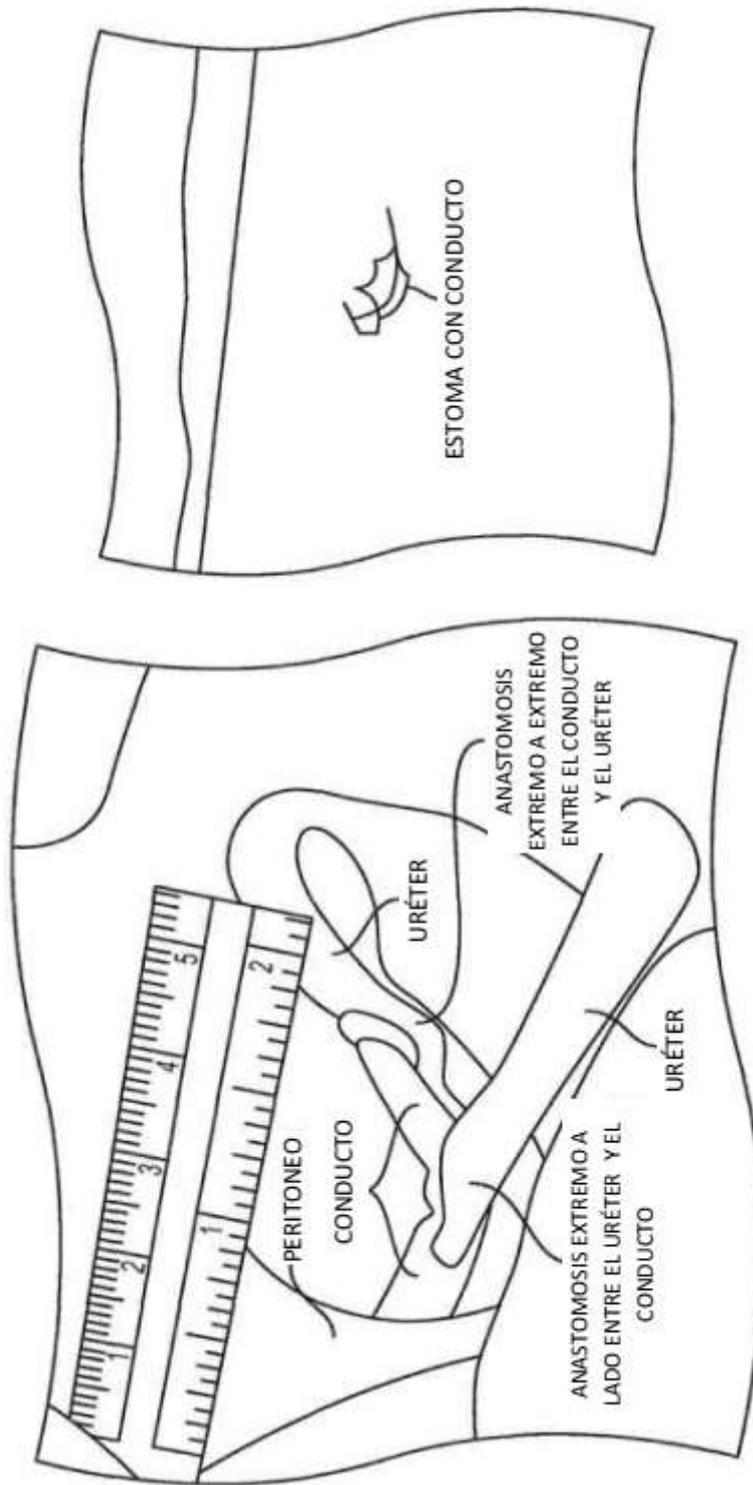


FIG. 9A

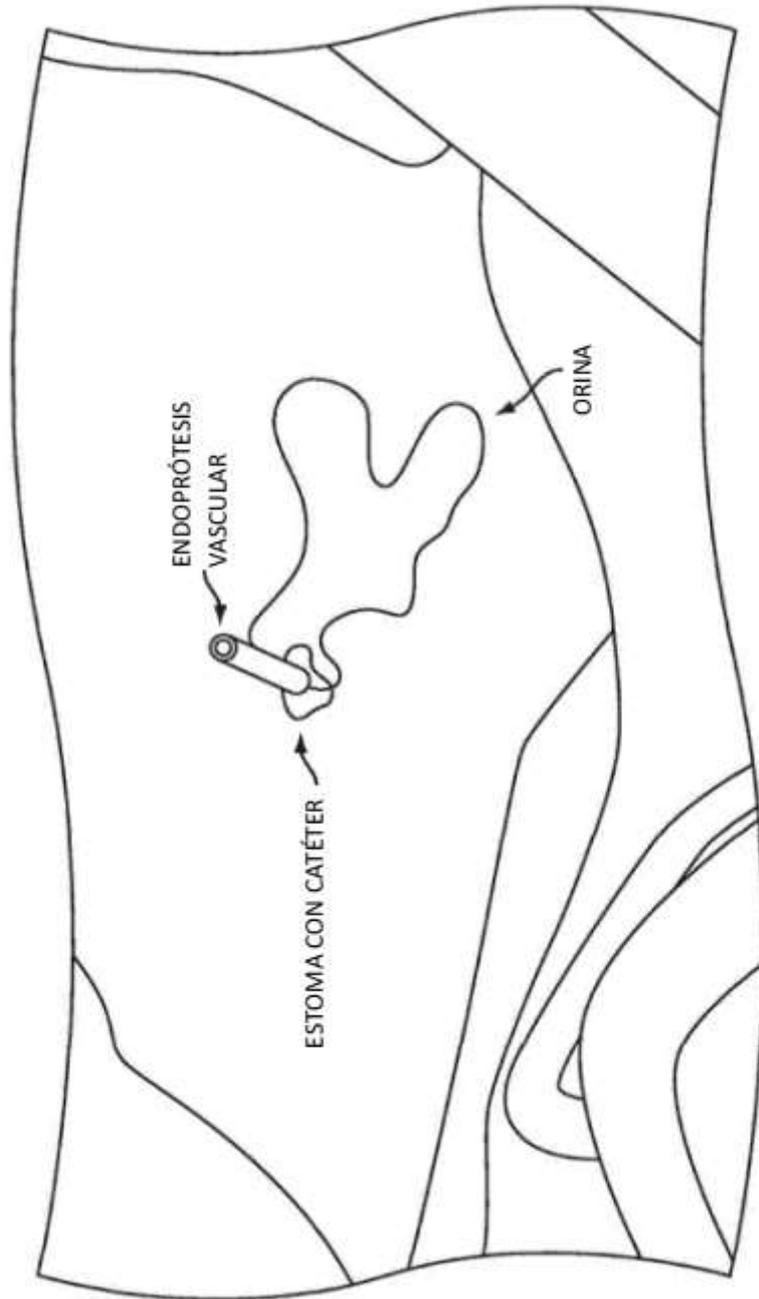


FIG. 9B

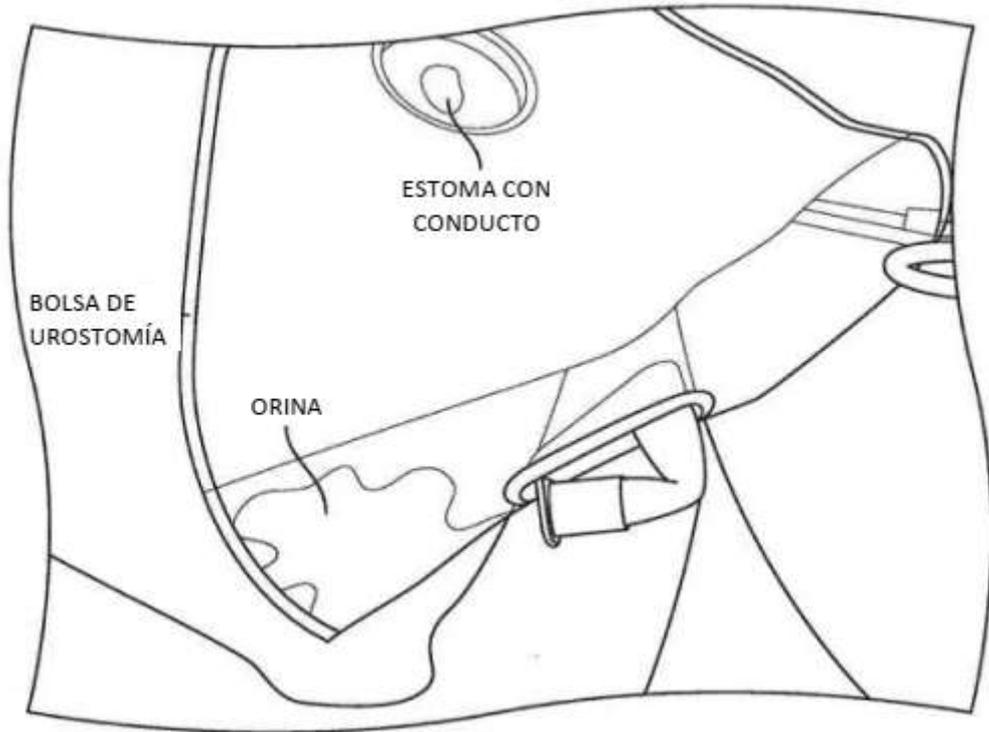


FIG. 9C

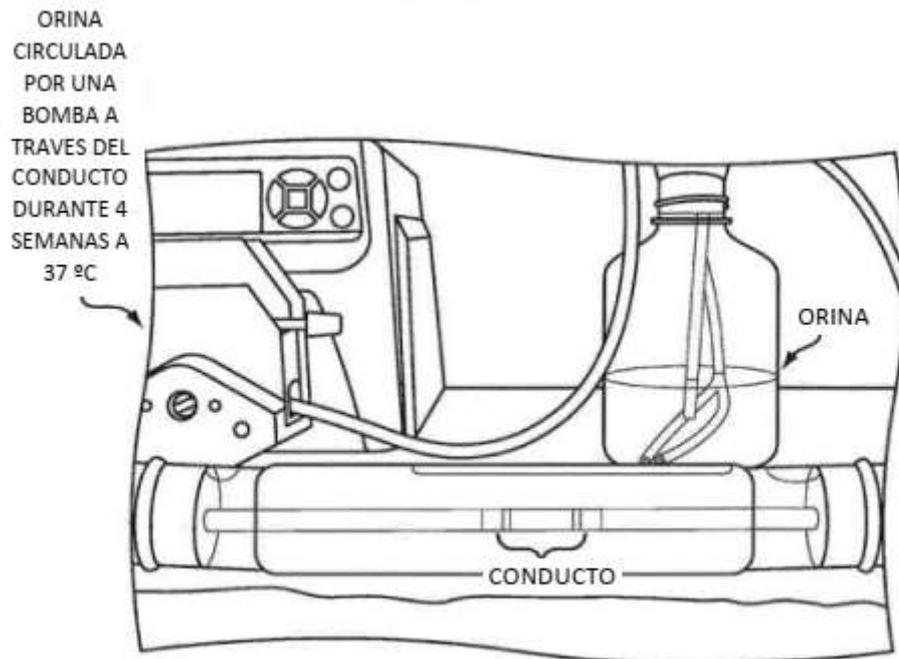
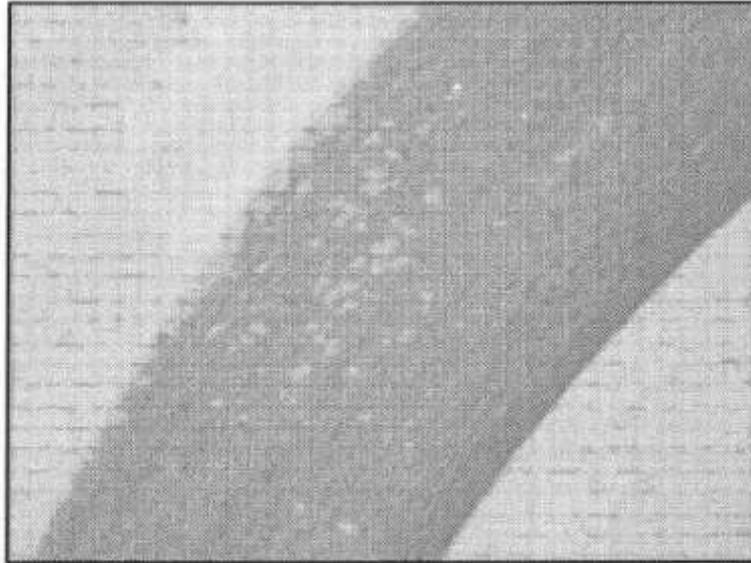
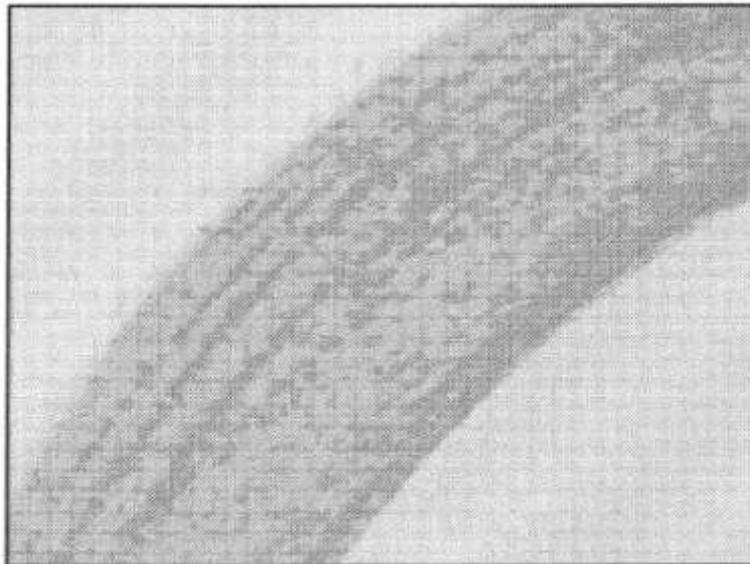


FIG. 9D



CONDUCTO ANTES DE LA EXPOSICIÓN A LA ORINA



CONDUCTO DESPUÉS DE LA EXPOSICIÓN A LA ORINA DURANTE 4 SEMANAS A 37 °C

FIG. 9E

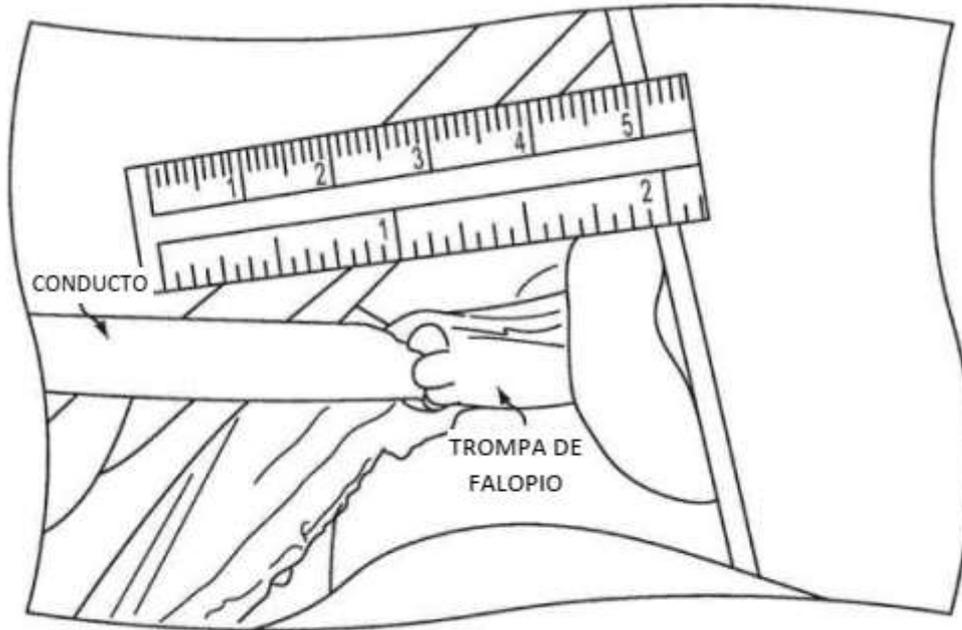


FIG. 10