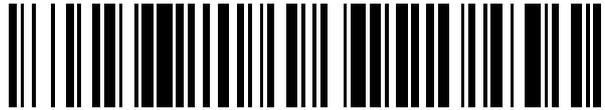


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 843 650**

51 Int. Cl.:

**A61L 27/36** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.07.2013 PCT/GB2013/051898**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.01.2014 WO14013241**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.07.2013 E 13750093 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.10.2020 EP 2874674**

54 Título: **Implante y procedimiento de producción de un implante**

30 Prioridad:

**18.07.2012 GB 201212771**

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

**20.07.2021**

73 Titular/es:

**VIDEREGEN LIMITED (100.0%)  
Innovation Centre 1, Liverpool Science Park, 131  
Mount Pleasant  
Liverpool L3 5TF, GB**

72 Inventor/es:

**SIBBONS, PAUL DAVID y  
ANSARI, TAHERA IQBAL**

74 Agente/Representante:

**MARTÍN SANTOS, Victoria Sofia**

**ES 2 843 650 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

Implante y procedimiento de producción de un implante

5

La presente invención se refiere a un implante y a un procedimiento para producir un implante a partir de tejido intestinal.

10 Los implantes que comprenden andamios de origen biológico se han convertido en opciones importantes para la reparación y regeneración de tejidos o de órganos en el tratamiento de diversas enfermedades y afecciones. Un obstáculo importante continuo es la necesidad de un suministro de sangre funcional para el andamio implantado.

15 Los pacientes con síndrome del intestino corto (SBS por sus siglas en inglés de "*short bowel syndrome*") carecen de más de la mitad de su intestino delgado, lo que puede ser causado por una serie de trastornos y generalmente resulta en una resección quirúrgica. Unos implantes adecuados serían útiles en el tratamiento de SBS. Las enfermedades intestinales, como la enfermedad de Crohn en adultos y la enterocolitis necrotizante en lactantes, son enfermedades que pueden provocar el síndrome del intestino corto (SBS) y la consiguiente insuficiencia de absorción de nutrientes que requiere un trasplante de intestino. Este es un problema clínico importante que da como resultado una disminución en la calidad de vida, una menor esperanza de vida y una dependencia a costosos regímenes de atención crónica para la supervivencia. Se estima que se gastan 700 millones de libras esterlinas por año solo en nutrición parenteral (excluyendo enfermería y otros cuidados) para SBS en la UE y EE. UU.

25 Estudios anteriores han utilizado andamios sintéticos y biológicos para producir segmentos cortos de tejido neo-intestinal. Por ejemplo, la submucosa del intestino delgado porcino (SIS por sus siglas en inglés de "*small intestine sub-mucosa*") descelularizada, una matriz acelular a base de colágeno utilizada para la regeneración o el aumento de sistemas biológicos enfermos o no funcionales, se ha empleado con éxito para regenerar el intestino delgado en modelos de pequeños animales. Sin embargo, la SIS no retiene el suministro vascular original al tejido, lo que resulta en una perfusión limitada. Además, la SIS tiene propiedades mecánicas y regenerativas relativamente malas.

30 Un obstáculo crítico en la capacidad de crear tejido grueso complejo o multicapa es el requisito de un suministro vascular adecuado que puede ser el factor limitante que gobierna el tamaño de la construcción de tejido. Con esto en su lugar, el traslado de la implantación de andamios a pequeña escala a injertos más grandes de gran relevancia clínica real se vuelve más factible. Un suministro vascular preexistente o de rápido desarrollo hacia un andamio implantado tiene que ser capaz de proporcionar todo el oxígeno, los nutrientes y los factores de crecimiento necesarios para asegurar la supervivencia. Las distancias de difusión de 100  $\mu\text{m}$  a 200  $\mu\text{m}$  limitan la supervivencia de las células del capilar más cercano y dado que los vasos sanguíneos pueden tardar días en desarrollarse, la falta de oxígeno disponible puede predisponer potencialmente al implante a la isquemia.

35 Los procedimientos de vascularización han tendido a centrarse en la síntesis de vasos sanguíneos de novo más que en la utilización de la vasculatura existente adherida al andamio biológico. Dado que el crecimiento de los vasos del huésped en un injerto implantado puede tardar algunas semanas en producirse, los injertos a menudo se ven amenazados por la isquemia y la necrosis.

45 Recientemente, un grupo en Alemania ha desarrollado un procedimiento para obtener un andamio biológico con una arteria y una vena de alimentación como parte integral del andamio. La vasculatura se puede anastomosar directamente al suministro de sangre del huésped y presenta la posibilidad de re-endotelización cuando se une al huésped o in vitro antes de la implantación (Linke y col. (2007) Ingeniería de tejidos 13 (11): 2699-2707; Mertsching y col. (2009) Trasplante 88 (2): 203-210; Schanz y col. (2010) Revista de biotecnología 148 (1): 56-63).

50 El documento EP1230939A describe una matriz de tejido vascularizada primaria bioartificial obtenida proporcionando una porción de tejido de por ejemplo el intestino, con una vascularización intacta y descelularizándolo al menos parcialmente.

55 H.Mertsching et al, Biomaterials 26 (33), páginas 6610-6617 (2005) describe un procedimiento para diseñar un andamio biológico con una arteria de alimentación preservada, una vena de drenaje y una red capilar funcional para el suministro de injertos. El procedimiento comprende descelularizar un segmento de intestino, incluyendo su pedículo de arteria y vena.

60 G. Totonelli et al, Biomaterials 33 (12), páginas 3401-3410 (2012) describe un procedimiento para preparar un andamio de intestino delgado descelularizado perfundiendo tanto el lumen intestinal como el árbol vascular con desoxicolato de sodio durante cuatro horas.

65 El documento WO2007/025233 describe un sistema para descelularizar un órgano o tejido, que comprende un dispositivo de canulación y un aparato de perfusión para perfundir el órgano o tejido a través de la cánula.

La presente invención proporciona un procedimiento mejorado para producir un implante para la reparación de

tejidos / órganos, derivándose el implante de tejido intestinal.

Según la presente invención, se proporciona un procedimiento para producir un implante a partir de tejido intestinal, comprendiendo el tejido intestinal un segmento tubular de intestino con al menos parte de su vasculatura asociada intacta, comprendiendo el procedimiento:

perfundir la vasculatura a través de un vaso de la misma con una serie de medios descelularizantes en los que la serie de medios comprende al menos un detergente, al menos una proteasa y al menos una DNasa, y

perfundir por separado el segmento tubular del intestino a través de su lumen con una serie de medios descelularizantes, en donde la serie de medios comprende al menos un detergente, al menos una proteasa y al menos una DNasa, en donde la perfusión de la vasculatura se lleva a cabo de acuerdo con un primer protocolo de perfusión y la perfusión del segmento tubular de intestino se lleva a cabo de acuerdo con un segundo protocolo diferente y en el que el primer y segundo protocolos difieren en sus respectivos medios de descelularización y/o tiempos de perfusión.

El andamio resultante proporciona un excelente implante para la reparación y regeneración del tejido intestinal. El andamio comprende una arteria de alimentación permeable, una vena de drenaje y conexiones microvasculares. El procedimiento de la presente invención se puede aplicar a segmentos cortos de intestino para proporcionar implantes que permitan una reducción en los requisitos de nutrición parenteral en pacientes con SBS y con insuficiencia intestinal, o en segmentos que sean lo suficientemente largos para proporcionar implantes que permitan el cese completo de los requisitos de nutrición parenteral.

El andamio incorpora dos componentes: el componente tubular derivado del segmento tubular del intestino y el componente vascular derivado de la vasculatura asociada. Cuando se implanta, el componente vascular del andamio proporciona una ruta inmediata para el suministro de sangre al andamio y suministra oxígeno y nutrientes al andamio a medida que se regenera en el receptor del implante. El componente vascular suministra sangre sistémica profundamente en las vellosidades del componente tubular del andamio.

Preferiblemente, la vasculatura se perfunde introduciendo el medio descelularizante a través de una arteria del mismo, lo más preferiblemente la arteria principal o una de las arterias principales. La arteria puede canularse para facilitar la perfusión. El medio descelularizador puede salir de la vasculatura a través de una vena, como la vena principal o una de las venas principales.

Para facilitar la perfusión del segmento tubular de intestino, se pueden proporcionar medios de entrada y/o salida. Por ejemplo, los tubos se pueden unir a un extremo proximal y/o distal del segmento tubular del intestino, por ejemplo, atando o cosiendo.

Por lo general, se usa una bomba para garantizar una perfusión eficaz.

El procedimiento se puede usar para proporcionar un andamio sustancialmente descelularizado en el que las células se eliminan sustancialmente, habiendo eliminado el andamio suficiente material celular y componentes asociados de modo que no se observe reactividad tisular adversa o reacción inmune en vivo. La reactividad puede medirse mediante implantación subcutánea. El andamio sustancialmente descelularizado está libre de células, tal como se visualiza mediante microscopía a 40 aumentos.

En una revisión reciente de los procesos de descelularización de tejidos y órganos completos (Crapo y col. (2011) Biomateriales 32: 3233-3243) se propuso que los siguientes criterios mínimos, además de la ausencia de respuesta a efectos adversos en vivo, suficiente para satisfacer la intención de descelularización de la matriz extracelular (ECM por sus siglas en inglés de "*extracellular matrix*"): <50 ng dsDNA por mg ECM de peso seco [dsDNA en inglés o ADNbc en español]; <200 pb de longitud del fragmento de ADN; y falta de material nuclear visible en secciones de tejido teñidas con DAPI o H&E.

Estos criterios son satisfechos mediante la presente invención, habiéndose encontrado que el ADN restante en andamios representativos derivados de íleon según la presente invención es típicamente menos del 1% de tejido nativo (tanto íleon como vasos sanguíneos). Esto es comparable a las cantidades de ADN que se encuentran en las matrices biológicas acelulares disponibles comercialmente utilizadas en aplicaciones clínicas, y significativamente menor que el contenido nuclear que se encuentra en otros andamios de la ECM bajo investigación preclínica. En particular, Mertsching et al., informaron mediciones de ADN residual 100 veces mayores que las obtenidas típicamente por la presente invención. Un mayor contenido de ADN residual puede conducir a respuestas celulares y tisulares subóptimas debido a la reacción del huésped al ADN residual, lo que afectará la capacidad regenerativa del tejido.

El andamio restante comprende ECM, en particular colágeno y elastina. El colágeno típicamente comprende principalmente colágeno de tipo I más colágeno de tipo III y tipo V. Por ejemplo, el análisis de colágeno de un andamio representativo de acuerdo con la presente invención reveló alrededor del 68% de colágeno de tipo I,

alrededor del 20% de colágeno de tipo III y alrededor del 12% de colágeno de tipo V.

El contenido de colágeno y elastina de los tejidos vasculares naturales y las cantidades relativas de estas proteínas varían considerablemente entre diferentes vasos sanguíneos. A modo de ejemplo, el contenido de colágeno en algunas arterias puede variar entre alrededor del 5% y alrededor del 25% y en algunas venas puede variar entre alrededor del 20% y alrededor del 45%. El contenido de elastina en algunas arterias puede variar entre alrededor del 20% y alrededor del 60% y en algunas venas puede variar entre alrededor del 15% y alrededor del 40%. Se apreciará, por tanto, que las cantidades relativas de colágeno, elastina y otros componentes de ECM pueden variar según los materiales de partida.

Además, se apreciará que las cantidades relativas de los diversos componentes de ECM típicamente difieren entre el componente tubular del andamio y el componente vascular del andamio. En el componente tubular, derivado del intestino, el colágeno es típicamente la proteína predominante.

Por tanto, el andamio descelularizado no es inmunogénico, es biocompatible y proporciona una funcionalidad inmediata.

La estructura del ECM se conserva al menos parcialmente en el andamio y preferiblemente se conserva sustancialmente. Por tanto, el andamio puede comprender fibras de colágeno y / o fibras de elastina que presentan una arquitectura de fibra original y una ultraestructura molecular del material de tejido natural del que se deriva. Preferiblemente, las estructuras tridimensionales naturales de estas proteínas de tejido fibroso se retienen sustancialmente.

Se sabe que los componentes celulares específicos para el origen del andamio y/o el lugar de su implantación invocarán una remodelación constructiva adecuada de la ECM solo cuando la arquitectura polimérica única de las fibras dentro de los tejidos u órganos descelularizados permanezca al menos parcialmente intacta. Por lo tanto, la ECM es más adecuada que cualquier matriz sintética para provocar una remodelación regenerativa funcional y proporcionar un andamio exitoso para el crecimiento intestinal.

La preservación de las proteínas ECM funcionales también es importante para el mantenimiento de la actividad biológica, la integridad estructural, la durabilidad y las propiedades físico-mecánicas del andamio. El mantenimiento y preservación de la jerarquía de la estructura desde la estructura molecular de proteínas y GAG (es decir, secuencias de aminoácidos y carbohidratos / azúcares, enlaces e interacciones) hasta la ultraestructura macroscópica del intestino y los tejidos vasculares asociados es importante para la preservación de propiedades físico-mecánicas inherentes de los tejidos que a su vez son importantes para el correcto funcionamiento intestinal (movimiento, expansión y contracción). Además, la función y la respuesta celular están determinadas en parte por señales o señales estructurales o topográficas inherentes al tejido natural. En otras palabras, la estructura del tejido juega un papel en la determinación del destino y la diferenciación celular. Por lo tanto, la preservación de las estructuras tridimensionales durante la descelularización y el procesamiento de tejidos mejora en gran medida la repoblación celular final del tejido intestinal y vascular y la regeneración de la función celular y específica del tejido.

Se sabe que la mayoría de los GAG [*del inglés "glycosaminoglycan" o en español "glicosaminoglicanos"*] están asociados con células o con ECM. La presente invención preserva preferentemente los GAG derivados / localizados de ECM mientras elimina sustancialmente los GAG asociados a células. Por tanto, el proceso de descelularización da como resultado una reducción de los GAG totales mediante la eliminación de células y constituyentes celulares, incluidos los GAG asociados a células. Los GAG asociados con ECM, por otro lado, se conservan preferiblemente en gran medida. Esto es importante ya que existe una "intercomunicación" entre ECM GAG y diferentes tipos de células, lo que ayuda a dirigir el tráfico celular y la diferenciación celular. Las ECM GAG también sirven como almacén o sumidero de factores de crecimiento, lo que ayuda a dirigir la regeneración del tejido después de la implantación del andamio.

Por tanto, los medios de descelularización se seleccionan para agotar las células y los componentes celulares del tejido intestinal mientras se minimiza el daño a las proteínas ECM, lo que da como resultado un andamio en el que la estructura y función de ECM se conservan en la medida de lo posible.

La descelularización se lleva a cabo mediante perfusión con varias soluciones descelularizantes. Los medios de descelularización adecuados incluyen detergentes, tales como dodecilsulfato de sodio (SDS), enzimas proteolíticas, por ejemplo tripsina, y desoxirribonucleasas (DNasas) tales como DNasa I, y combinaciones de las mismas.

Por lo tanto, la perfusión puede comprender el tratamiento con una serie de medios diferentes, y puede incluir de manera útil etapas de lavado con un medio de lavado adecuado o medios, tales como solución salina tamponada con fosfato (PBS por sus siglas en inglés de "*phosphate buffered saline*").

La perfusión se puede realizar en presencia de antibióticos.

Se han observado resultados particularmente buenos usando perfusiones seriadas de soluciones de SDS, tripsina y DNasa I, lavadas entre cada etapa usando PBS, para descomponer las células, los componentes citoplásmicos y el

ADN.

De manera importante y ventajosa, la presente invención proporciona una descelularización separada del componente tubular y el componente vascular del tejido intestinal. La descelularización de la vasculatura más frágil se logra típicamente más rápidamente que el componente tubular más grueso y complejo. Por lo tanto, se adopta un protocolo de perfusión diferente para cada uno de estos componentes, con el fin de optimizar la descelularización mientras se minimiza el daño a la ECM y sus componentes. Esto proporciona un procesamiento de tejidos más efectivo y eficiente y da como resultado un andamio mejorado.

Por tanto, la perfusión de la vasculatura se lleva a cabo de acuerdo con un primer protocolo de perfusión y la perfusión del segmento tubular de intestino se lleva a cabo de acuerdo con un segundo protocolo de perfusión diferente. El primer y segundo protocolos de perfusión pueden diferir en sus respectivos medios de descelularización y/o condiciones de tratamiento, incluidos los tiempos de reacción, concentraciones de reactivos, etc.

Durante la perfusión, el tejido se trata típicamente en un medio de incubación. El medio de incubación puede incluir al menos un medio de descelularización, para maximizar la eficacia del proceso de descelularización. El medio o medios de descelularización pueden ser iguales o similares al medio o medios de descelularización utilizados en la perfusión de la vasculatura y/o el componente intestinal tubular. En realizaciones preferidas que utilizan una serie de soluciones descelularizantes para la perfusión de la vasculatura y/o el componente tubular del tejido intestinal, se utilizan soluciones iguales o similares como medio de incubación. Preferiblemente, las composiciones de estos medios de incubación corresponden sustancialmente a las composiciones de la serie de soluciones descelularizantes utilizadas para profundir el componente vascular del tejido intestinal.

El procedimiento de acuerdo con la presente invención mejora enormemente el procesamiento de tejidos en comparación con los procedimientos previamente conocidos en la técnica, en los que las soluciones de descelularización se perfunden en el tejido a través de la vasculatura únicamente, confiando en la difusión para descelularizar y purificar el tejido del intestino delgado. Esto da como resultado una descelularización y purificación subóptimas de los dos tipos de tejido (es decir, los tejidos vascular y del intestino delgado), ya que el proceso solo puede optimizarse para un tejido y suboptimizarse para el otro, o bien ser genérico y subóptimo para ambos. Dichos procedimientos de la técnica anterior se describen en Mertsching et al., en donde el enfoque de este informe es aparentemente la provisión de una estructura de tejido tubular genérico para su uso en la reconstrucción de tejido no específico, y en donde por su parte en Linke et al., se utilizó tejido descelularizado como un 'biorreactor' para células hepáticas. Por el contrario, la presente invención proporciona protocolos separados de descelularización y purificación para los componentes vasculares y tubulares intestinales, que están diseñados para optimizar la descelularización y purificación de cada una de estas estructuras tisulares a la vez que se preservan ciertas estructuras tridimensionales específicas de tejido.

En realizaciones preferidas, la capa mucosa del componente tubular, que puede incluir la microestructura asociada y macroestructuras funcionalmente importantes tales como vellosidades y criptas, se retiene al menos parcialmente en el andamio. Esto contrasta con los procedimientos de la técnica anterior, en los que la capa mucosa se elimina del lumen del tejido del intestino delgado. Por ejemplo, Mertsching et al., eliminaron la estructura de la mucosa, presumiblemente porque no era su intención utilizar el tejido del intestino delgado procesado para la reparación del intestino delgado, sino que sirviera como una estructura tubular genérica para la reconstrucción de otros tejidos. La capa mucosa preferiblemente no se elimina en la presente invención y preferiblemente se conserva sustancialmente.

También se prefiere que la capa submucosa del componente tubular quede retenida al menos parcialmente en el andamio. Además, se prefiere que la capa serosa del componente tubular quede retenida al menos parcialmente en el andamio. Además, se prefiere que las capas musculares circulares y/o longitudinales del componente tubular estén retenidas al menos parcialmente en el andamio. Por tanto, estas capas de tejido preferiblemente no se eliminan y pueden conservarse sustancialmente en el implante.

Al retener estos componentes estructurales clave de la parte tubular, intestinal, del andamio, la presente invención asegura que la anatomía del andamio sea lo más cercana posible a la original. Esto tiene beneficios en la regeneración del tejido después de la implantación, de modo que las estructuras tisulares serán 'reconocidas' a nivel celular y repobladas por los tipos de células específicos apropiados, lo que ayuda a la diferenciación y asegura que el cuerpo no necesite recrear las capas estructurales. Las capas estructurales intactas, en particular las capas musculares, mejoran en gran medida la resistencia inherente del andamio, lo que mejora la durabilidad y la resistencia del implante después de la implantación. De manera ventajosa, esto también ayuda al asegurar las tensiones físicas y las propiedades biomecánicas adecuadas, que a su vez contribuirán al desarrollo y la diferenciación celular.

También se ha observado que la metodología optimizada de descelularización y purificación según la presente solicitud puede preservar las estructuras nerviosas y del tracto nervioso dentro del tejido del intestino delgado procesado. Esto es ventajoso porque las estructuras nerviosas preservadas sirven como condimentos y andamios para el recrecimiento y la regeneración de los nervios y están ubicadas en general en las posiciones anatómicas y naturales correctas tal como se conservan del tejido natural. La función intestinal se basa en los movimientos peristálticos del tejido intestinal para impulsar el contenido intestinal a lo largo del tracto digestivo hacia el ano. Esto

5 se realiza en parte por la propagación de ondas peristálticas derivadas de células y también por estimulación nerviosa. Por lo tanto, la función peristáltica intestinal correcta requiere una combinación de estímulos derivados de nervios y derivados de células. Ambos mecanismos cuentan con la ayuda de andamios de acuerdo con las realizaciones de la presente invención, mediante la preservación de estructuras de tejido tridimensionales que conducen a la regeneración celular específica de tejido y mediante la preservación de los tractos nerviosos para que sirvan como conductos para que ocurra una nueva regeneración nerviosa.

10 La parte vascular del implante tal y como se describe en este documento se puede proporcionar como una estructura tubular sustancialmente intacta, cuyo diámetro puede variar de acuerdo con la naturaleza del material de partida. También se apreciará que la longitud de la parte vascular del implante puede ajustarse fácilmente mediante un corte apropiado antes o después del procesamiento del tejido, o en cualquier etapa durante el procesamiento. Por tanto, durante el uso, la porción vascular procesada del tejido puede cortarse al tamaño correcto para el procedimiento o sitio de implante particular.

15 Preferiblemente, la túnica adventicia del tejido vascular se conserva al menos parcialmente. También preferiblemente, la túnica media del tejido vascular se conserva al menos parcialmente. También preferiblemente, la túnica íntima del tejido vascular se conserva al menos parcialmente. Estas estructuras de tejido se pueden conservar sustancialmente en el implante.

20 Además, la capa de elastina de la laminilla elástica interna se puede conservar al menos parcialmente y preferiblemente se conserva sustancialmente formando una superficie luminal interna en la porción vascular del implante.

25 El procedimiento de la presente invención puede proporcionar un implante derivado de tejido intestinal, que comprende un componente tubular derivado de un segmento tubular del tejido intestinal y un componente vascular derivado de la vasculatura asociada, en el que una superficie luminal del componente vascular comprende la laminilla elástica interna que muestra la arquitectura original de la fibra de elastina y la ultraestructura molecular de la vasculatura de la que se deriva.

30 Los materiales de partida para la presente invención se pueden obtener de cualquier mamífero humano o no humano. En algunas realizaciones, se prefiere que los materiales de tejido intestinal porcino se procesen para proporcionar el implante, aunque se entenderá que pueden emplearse alternativamente otras fuentes de mamíferos.

35 El intestino delgado es el tejido intestinal preferido, por ejemplo, el íleon con su arcada mesentérica adjunta.

El segmento de intestino tubular se recolecta con cuidado para minimizar el daño al tejido intestinal.

40 Se ha informado previamente que ciertas partes del sistema vascular pueden estar descelularizadas, como arterias y venas. Cada uno requiere metodologías de descelularización específicas para lograr una descelularización sin dañar la estructura tisular. La presente invención permite la descelularización del espectro de tejido vascular que va desde las principales arterias irrigantes, arterias de pequeño diámetro, arteriolas, capilares (tanto vasculares como venosos), vénulas y venas. En esencia, el sistema vascular completo (o 'árbol' vascular) asociado con el tejido intestinal, tanto alimentando como drenando el tejido intestinal tubular e integrado dentro del tejido intestinal tubular, se descelulariza mediante un único protocolo sustancialmente sin dañar o interrumpir ningún aspecto. .

45 Por tanto, la presente invención proporciona un procedimiento mediante el cual el árbol vascular completo asociado con el tejido intestinal se puede descelularizar eficazmente, a la vez que se mantiene sustancialmente la ECM y la estructura de los vasos mayores y menores del tejido vascular. Esto se evidencia en el uso por la reperfusión de la porción vascular del andamio descelularizado sin fugas ni trombosis significativas.

50 Para lograr la funcionalidad fisiológica y bioquímica, puede ser deseable volver a sembrar el andamio intestinal descelularizado con células capaces de diferenciarse y desarrollarse en tipos de células específicas del intestino. Se pueden usar muchos tipos y fuentes de células para lograr esto, que van desde células alogénicas, incluidas células madre y mezclas de células, hasta células autólogas derivadas del paciente. Las células seleccionadas pueden manipularse y expandirse para proporcionar células adecuadamente diferenciadas en número suficiente para resembrar el andamio y/o pueden incubarse sobre y/o dentro del andamio descelularizado para permitir la repoblación y regeneración de la población y función celular. El proceso puede realizarse en un biorreactor.

60 En algunas realizaciones, se prefiere que las células sean células autólogas, lo que minimiza cualquier potencial de reacción inmunitaria o rechazo de las células resembradas una vez implantadas en el paciente. Además, es preferible utilizar células madre mesenquimales adultas derivadas del tejido adiposo (grasa) del paciente para recelularizar el andamio. El tejido adiposo es el tejido donante de elección, ya que contiene una alta proporción de células madre (Eberli y Atala (2006) Methods in Enzymology 420: 287-302), típicamente alrededor de 100-1000 veces más que la médula ósea. Además, la grasa es fácilmente accesible, está presente en todas las personas y el cuerpo la regenera fácilmente. Adicional o alternativamente, pueden usarse células intestinales autólogas, opcionalmente en combinación con células madre mesenquimales autólogas. Las células intestinales pueden comprender una mezcla de células, tales como células epiteliales, mesénquima y células madre intestinales, ya sea

por separado o agregadas en unidades organoides multicelulares. Una pequeña proporción de células intestinales, como las unidades de tipo organoide, puede actuar como semilla o plantilla para ayudar a impulsar la diferenciación apropiada de las células co- sembradas derivadas del tejido adiposo y las células que se infiltran naturalmente después de la implantación.

5 Preferiblemente, el aislamiento de células autólogas y la resiembra del andamio descelularizado se realiza en el quirófano, con una manipulación celular mínima. El andamio resembrado se puede entonces anastomiar a un suministro de sangre en el paciente para asegurar la perfusión del andamio y el suministro de oxígeno, nutrientes y células al andamio. El andamio perfundido y resembrado puede colocarse en el abdomen del paciente, 10 preferiblemente con un estoma como extremo distal y conectado al intestino existente del paciente, pero fuera del circuito del flujo intestinal existente. Entonces, el paciente asume efectivamente el papel de un biorreactor y la regeneración intestinal puede ocurrir mediante la regeneración natural del tejido. El estoma se puede utilizar como medio de visualización para determinar el progreso de la regeneración intestinal en el andamio resembrado. Una vez que ha tenido lugar la regeneración suficiente, el intestino ahora funcional puede anastomizarse al intestino existente 15 del paciente y conectarse en circuito con el flujo intestinal.

En realizaciones alternativas, la resiembra del andamio descelularizado puede realizarse fuera del quirófano, por ejemplo en un laboratorio o en un biorreactor, para proporcionar un "órgano" regenerado con alguna función que luego se puede "trasplantar" al paciente.

20 Las células madre son pluripotentes, es decir, pueden dar lugar a muchos tipos de células diferentes específicas de tejidos u órganos particulares. El andamio intestinal descelularizado contiene la estructura de tejido natural, reconocible por las células como la estructura natural nativa del intestino. Este 'mensaje' estructural o topográfico indicará a las células madre que se diferencien en células específicas de ese órgano mediante un proceso de 25 regeneración guiada por matriz. Las células luego se multiplican para repoblar el andamio y desarrollar funciones bioquímicas / fisiológicas específicas del intestino, creando así un órgano vivo funcional a partir de las propias células del paciente.

Por tanto, los procedimientos de la presente invención pueden incluir una etapa de resembrar el implante con 30 células. De forma similar, los implantes de la presente invención pueden ser implantes resembrados con células.

Las realizaciones de la presente invención se describirán ahora con más detalle con referencia a los siguientes ejemplos no limitativos y figuras adjuntas en las que:

35 La figura 1 es una representación esquemática de la anatomía del intestino delgado y su vasculatura asociada.

La figura 2 es un diagrama esquemático de un sistema de perfusión utilizado en un procedimiento según la 40 presente invención.

La figura 3 es una fotografía que muestra un segmento tubular de tejido intestinal con vasculatura intacta antes del tratamiento.

45 La figura 4 es una fotografía que muestra un implante representativo proporcionado por un procedimiento según la presente invención, producido a partir del material de partida mostrado en la figura 3.

La figura 5A es una fotomicrografía (aumento final x40) que muestra una sección de un implante representativo fabricado según la presente invención, teñido con Picro Sirius Red y visto bajo luz 50 polarizada.

La figura 5B es una fotomicrografía (aumento final x100) que muestra una sección de un implante representativo fabricado según la presente invención, teñido con rojo Picro-sirius y elastina de Miller. La flecha doble muestra la capa mucosa y las flechas pequeñas señalan la elastina preservada dentro de los 55 vasos submucosos de pequeño calibre.

La figura 6A es una fotografía que muestra un implante representativo realizado según la presente invención 1 hora después de la implantación en un receptor porcino. Las puntas de las flechas apuntan a los vasos mesentéricos sin coágulos.

60 La figura 6B es una fotografía que muestra una vista alternativa del implante de la figura 6A. Las flechas apuntan a microconexiones intestinales con vasos descelularizados distinguibles.

La figura 7A es una fotomicrografía (aumento final x20) que muestra una sección de un implante representativo fabricado según la presente invención, teñido con hematoxilina y eosina 1 hora después de 65 la implantación en un receptor porcino. Esta sección longitudinal muestra la vena mesentérica y la arteria con lúmenes libres de coágulos.

La figura 7B es una microfotografía (aumento final x20) que muestra una sección de un implante representativo fabricado de acuerdo con la presente invención, teñido con hematoxilina y eosina 24 horas después de la implantación en un receptor porcino. Esta sección transversal de la arcada mesentérica muestra vasos (flechas oscuras) y células inflamatorias libre de coágulos que se infiltran en las partes externas del injerto (flechas claras).

La figura 8A es una fotomicrografía (aumento final x100) que muestra una sección de un implante representativo fabricado según la presente invención, teñido con hematoxilina y eosina 1 hora después de la implantación en un receptor porcino. Esta sección longitudinal del sitio anastomótico arterial del injerto muestra células huésped que infiltran la arteria mesentérica superior descelularizada (véanse las flechas).

La figura 8B es una fotomicrografía (aumento final x200) que muestra una sección de un implante representativo fabricado de acuerdo con la presente invención, teñido con hematoxilina y eosina 24 horas después de la implantación en un receptor porcino. Las flechas apuntan a las células CD133+ que recubren el lumen de la arteria descelularizada del injerto.

El intestino delgado y sus estructuras vasculares asociadas (10) se muestran en la figura 1. El intestino delgado es una estructura tubular (11) con un lumen central. La estructura tubular está compuesta por una capa serosa externa (12) que cubre dos capas musculares que comprenden una capa muscular longitudinal (13) y una circular (14). Debajo de las capas musculares se encuentra la submucosa intestinal (15) que está cubierta (en la cara interna del lumen intestinal) por una capa mucosa (16) cuya microestructura está compuesta por vellosidades, microvellosidades y criptas. El intestino delgado también tiene un suministro de sangre que comprende vasos de alimentación (arteriales) y de drenaje (venosos) que forman un árbol vascular (20) que finalmente se vuelve integral y se asocia con el tejido del intestino delgado en forma de arteriolas y capilares de alimentación (lado de suministro arterial) y capilares y vénulas de drenaje (lado de retorno venoso).

En el lado arterial (de alimentación), una arteria de alimentación (21) tiene múltiples ramificaciones subarteriales (22) que alimentan varias partes del intestino delgado. Las arterias y sus ramificaciones mismas están ubicadas en el pedículo vascular y rodeadas y sostenidas por tejido conectivo (el mesenterio) (23). Las ramificaciones arteriales alimentan las arteriolas y capilares asociados / integrales del intestino delgado (24). Estos vasos se encuentran en y dentro del tejido del intestino delgado y sirven para perfundir el tejido del intestino delgado con sangre y otros líquidos y células. La sangre y los líquidos drenan del intestino delgado a través de capilares y vénulas venosas integrales (25) que se encuentran en y dentro del tejido del intestino delgado. Posteriormente, estos vasos drenan o devuelven sangre y líquidos al retorno venoso principal (vena) (26) a través de múltiples ramificaciones venosas (ramificaciones de la vena de la vena de drenaje principal) (27).

## **Ejemplos**

Todos los reactivos se adquirieron de Sigma-Aldrich (Reino Unido) o Fisher Scientific (Reino Unido).

Todos los animales se mantuvieron y manipularon de acuerdo con la Ley de Procedimientos Científicos para Animales de 1986 y los estudios se realizaron siguiendo las pautas estipuladas y autorizadas por el Ministerio del Interior del Reino Unido. Los experimentos se realizaron utilizando cerdos cruzados Large White Landrace. Todos los animales se mantuvieron en condiciones estándar de laboratorio y se alimentaron con una dieta comercial granulada.

### **1. Preparación de andamio acelular**

#### **(a) Recolección de tejido intestinal porcino**

Después de la administración intravenosa de heparina (7 000 U) en un cerdo cruzado Large White Landrace de 60-65 kg, se realizó una incisión en la línea media y se aisló el segmento de íleon junto con su suministro vascular adjunto de aproximadamente 20-30 cm de longitud. Se disecaron los ganglios linfáticos residuales en el mesenterio; mantener toda la muestra a prueba de fugas; se anudó y aisló el extremo distal del pedículo. El extremo proximal de la arteria se canuló con un dispositivo de cánula intravenosa radiopaca de 14G y se enjuaga con NaCl al 0,9% que contiene heparina (2000 U) hasta que no haya sangre en el flujo de salida en el extremo proximal de la vena. Para mantener la presión intraluminal dentro de la vasculatura y mantener la permeabilidad, se unió a la cánula arterial una bomba pulsátil de perfusión heparinizada (2000 U / 1) con NaCl al 0,9% a través del pedículo. Se ataron todos los vasos que no estaban involucrados en el suministro del intestino delgado que se iba a explantar y se extrajo todo el explante del animal. Al final del procedimiento, se interrumpió al animal mediante una sobredosis intravenosa de anestesia. Se comprobó el circuito vascular en busca de fugas y se lavó el lumen intestinal con 1 litro de NaCl al 0,9%. En ambos extremos del segmento ileal, se unieron tubos de silicona con suturas en bolsa de tabaco y el

segmento de intestino delgado se unió al segundo circuito de perfusión. La muestra recolectada estaba lista para la descelularización.

La figura 3 muestra una muestra representativa preparada como se describe anteriormente. El segmento intestinal se llenó con solución salina y se sujetó con pinzas en cada extremo, lo que ayuda a visualizar la estructura intestinal, el sistema vascular y los capilares finos que recubren la superficie serosa. La arcada mesentérica, en la que se pueden ver claramente los vasos arteriales alimentadores y los vasos venosos de retorno, forma una estructura en forma de abanico en la parte interna del asa del segmento intestinal. El segmento intestinal tiene una apariencia rosada debido a la presencia de células y sangre en los vasos y tejidos.

(b) Descelularización del tejido intestinal porcino

Inmediatamente después de la explantación, se instalaron dos circuitos de perfusión separados para la descelularización del componente vascular y del componente intestinal tubular.

Como se muestra en forma esquemática en la figura 2, se instaló un sistema de perfusión (100) para procesar el tejido intestinal (101) que comprende un componente vascular (102) y un componente intestinal tubular (103). El circuito I se conectó mediante una cánula a la arteria principal (104) de la arcada mesentérica y salió por la vena principal (105) y el circuito II se conectó a los tubos de silicona atados a cada extremo del segmento tubular explantado del íleon (103). Se utilizaron bombas (106, 107 respectivamente) para bombear medios de descelularización por separado alrededor de los circuitos I y II, representando las flechas la dirección del flujo.

El protocolo de descelularización utilizado se presenta en la tabla 1:

**Tabla 1**

<i>CIRCUITO I Y II</i>			
	<b>Solución</b>	<b>Hora</b>	<b>Temperatura</b>
1.	0,075% solución SDS	90 min	25° C
2.	Solución de antibióticos	3 cambios; 15 min cada uno	25° C
3.	0,05% solución de tripsina	90 min	37° C
4.	Solución de antibióticos	3 cambios; 15 min cada uno	25° C
5.	Solución de DNasa I	120 min	37° C
6.	Solución de antibióticos	Durante la noche	4° C
7.	0,075% solución SDS	90 min	25° C
8.	Solución de antibióticos	3 cambios; 15 min cada uno	25° C
9.	0,05% solución de tripsina	90 min	37° C
10.	Solución de antibióticos	3 cambios; 15 min cada uno	25° C
<i>Circuito I</i>			
11.	Solución de antibióticos	Hasta el final del proceso	25-37° C
<i>Circuito II</i>			
11.	0,075% solución SDS	90 min	25° C
12.	Solución de antibióticos	3 cambios; 15 min cada uno	25° C
13.	0,05% solución de tripsina	90 min	37° C
14.	Solución de antibióticos	3 cambios; 15 min cada uno	25° C

El tejido intestinal se sumergió en las soluciones utilizadas para la perfusión a través del circuito I. La perfusión se realizó utilizando una bomba Watson Marlow 323S / D (Reino Unido) a una velocidad de 30-60 rpm durante todo el proceso. Las células, los componentes citoplásmicos y finalmente los ácidos desoxirribonucleicos se descomposieron mediante perfusiones en serie de soluciones de SDS, tripsina y DNasa I lavadas entre cada etapa

con PBS suministrado con antibióticos. Después de la última etapa de la descelularización, se separó la cánula de la arteria y los tubos de silicona del íleon. El andamio acelular se esterilizó colocándolo en una solución de ácido peracético al 0,1% en PBS en un agitador horizontal durante tres horas a temperatura ambiente. Posteriormente, la muestra se lavó en PBS estéril suplementado con antibióticos y se almacenó en PBS estéril provisto de antibióticos hasta su uso posterior.

El implante descelularizado resultante se muestra en la Figura 4. El implante intestinal descelularizado tiene un aspecto blanquecino, semitranslúcido, después de la extracción de células y sangre. El componente del intestino tubular se muestra sujeto y lleno con solución salina, lo que permite una mejor observación de la estructura intestinal conservada, la arcada mesentérica y los capilares finos que recubren la superficie serosa. La arcada mesentérica forma una estructura en forma de abanico en la parte interna del asa del segmento intestinal. El vaso arterial de alimentación y el vaso de retorno venoso están canulados y son claramente visibles.

(c) Análisis histológico y molecular del andamio acelular

Tres andamios acelulares representativos se sometieron a análisis histológico y molecular para detectar la presencia de material nuclear. Se utilizó tejido intestinal de animales de la misma edad y peso con fines comparativos; Se fijaron muestras de toda la longitud de la arcada ileal y mesentérica descollada en NBF al 10% y se procesaron para su inclusión en cera utilizando procedimientos de laboratorio de rutina. Las secciones se cortaron a 5 µm y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) y rojo Picro-Sirius con elastina de Miller (PSR-ME).

Se utilizaron 0,025g de cada andamio para el aislamiento de ADN utilizando el kit GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep (Sigma-Aldrich, Reino Unido) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La cantidad de ADN residual en la parte vascular e intestinal de la construcción de andamio, así como el ADN aislado del íleon nativo y los vasos asociados, se cuantificaron usando espectrofotómetro (AD = 260). Se llevó a cabo una separación electroforética de ADN para visualizar las diferencias en la presencia de ADN en las muestras de andamio acelular y tejidos nativos. El ADN se separó en gel de agarosa al 1% en tampón Tris-acetato de ácido etilendiaminotetraacético (TAE) durante 2 ha 100V. Posteriormente, el gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio durante 15 min.

La cantidad de GAG en los andamios acelulares se evaluó utilizando el ensayo de glucosaminoglicanos sulfatados Blyscan (Bicolor; Reino Unido) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ensayo se usó para calcular el contenido total de glucanos sulfatados de acuerdo con los valores de absorbancia espectrofotométrica (656nm) del nivel de sulfatación (capacidad de unión del colorante) calculados usando los estándares de ensayo suministrados (rango 2-50 µg / ml) de GAG. Los GAG se aislaron de tres lotes diferentes de muestras y la concentración se calculó utilizando una curva estándar. Los resultados se presentan como µg/g de peso húmedo. Los valores obtenidos para el andamio acelular se compararon con los valores del tejido intestinal porcino de control.

El análisis histológico del andamio descelularizado no mostró células intactas ni en la arcada mesentérica vascular ni en el tejido ileal. El análisis del tejido con luz polarizada en secciones teñidas con PSR-ME mostró una buena conservación vascular del colágeno y la elastina, con fibras de colágeno principalmente de color amarillo a naranja de la submucosa y fibras delgadas y verdes de la capa mucosa de apariencia similar al intestino nativo (véase la figura 5A). La tinción con H&E confirmó que la elastina se conservaba incluso dentro de los vasos submucosos de pequeño calibre (véase la figura 5B).

Aunque se detectó algo de ADN residual en la parte vascular e intestinal del andamio descelularizado, representó una disminución significativa en comparación con el tejido nativo. La cantidad total de ADN encontrado dentro del componente intestinal tubular del andamio descelularizado constituía solo el 0,75% del ADN total encontrado en el tejido nativo, mientras que la vasculatura descelularizada tenía menos del 1% del ADN total encontrado en los vasos sanguíneos nativos (tabla 2). Hubo una disminución en la cantidad de GAG que quedaba después del proceso de descelulación; en general, hubo una retención del 42% de GAG funcionales dentro del andamio descelularizado (tabla 2).

**Tabla 2**

Muestra	ADN (desviación estándar) [µg / mg]	GAG (desviación estándar) [µg / g]
Componente tubular ileal nativo	0,74 (0,17)	3,1 (0,05)
Componente vascular nativo	0,36 (0,08)	2,9 (0,03)
Componente tubular ileal descelularizado	0,005 (0,002)	1,1 (0,005)

Muestra	ADN (desviación estándar) [µg / mg]	GAG (desviación estándar) [µg / g]
Componente vascular descelularizado	0,004 (0,002)	0,9 (0,03)

**3. Implantación del andamio acelular en un receptor porcino**

5

**(a) Procedimiento quirúrgico**

10 Los cerdos grandes mestizos White Landrace (n = 7), (55-75 kg) se sometieron a una nefrectomía del lado derecho a través de una incisión en la línea media. El componente vascular (arteria de alimentación y vena de drenaje del pedículo ileal) del andamio se anastomosó de un extremo a otro a la arteria y vena renal. El sitio de la anastomosis así como la vasculatura mesentérica de la estructura de andamio implantada se revisaron para detectar cualquier sangrado. Se utilizaron suturas Mersilk para detener la pérdida excesiva de sangre. Una vez que se observó la perfusión de sangre a través de la arcada mesentérica y la fina red capilar que recubre el león descelularizado, se colocó todo el implante de andamio en la cavidad renal durante una hora y se monitorizaron los signos fisiológicos del animal. Posteriormente, el animal se eliminó con una inyección letal de pentobarbitona sódica (100 mg/kg).

15

20 Se implantó un andamio para un procedimiento de recuperación durante 24 horas. El andamio se colocó en la cavidad del riñón y las capas de los músculos abdominales se cerraron con sutura intramuscular (3,0 Vicryl) y piel con sutura de punto colchonero horizontal (3.0 Mersilk). Después de la operación, el animal recibió analgesia usando carprofeno intravenoso (4 mg/kg de peso corporal). Después de 24 horas, el animal se eliminó y el injerto se recogió inmediatamente.

20

25 Previo a la implantación quirúrgica del andamio se aplicó un protocolo de anticoagulación. Esto comprendió el pretratamiento del animal con fármacos antitrombóticos antes y durante el procedimiento quirúrgico, así como el preacondicionamiento de la parte vascular del implante inyectándolo con heparina sódica pura o disuelta en solución salina, como se muestra en la tabla 3.

25

30

**Tabla 3**

Animal Nº.	Procedimiento (terminal / recuperación)	Peso del cerdo [kg]	Heparina sódica administrada sistémicamente durante la implantación [U]	Heparina sódica aplicada en el andamio antes de la implantación [U]	Heparina sódica total recibida por animal / kg / h de procedimiento quirúrgico	Fármacos anticoagulantes / formadores de plaquetas adicionales recibidos por el animal [U / kg / h]
1.	Terminal	55	1. Post-incisión: 7000 2. Antes de soltar las pinzas vasculares: 1000	1000	55	-
2.	Terminal	60	1. Post-incisión: 7000 2. Antes de soltar las pinzas vasculares: 2.000	1000	51	-

Animal Nº.	Procedimiento (terminal / recuperación)	Peso del cerdo [kg]	Heparina sódica administrada sistémicamente durante la implantación [U]	Heparina sódica aplicada en el andamio antes de la implantación [U]	Heparina sódica total recibida por animal / kg / h de procedimiento quirúrgico	Fármacos anticoagulantes / formadores de plaquetas adicionales recibidos por el animal [U / kg / h]
3.	Terminal	73	1. Post-incisión: 7000 2. Antes de soltar las pinzas vasculares: 2000 3. Administrado en la arteria de alimentación del injerto: 2000	1000	82	1. Warfarina: 12 mg / día comenzando 3 días antes de la cirugía
4.	Terminal	70	1. Post-incisión: 10000 2. Antes de soltar las pinzas vasculares: 10000	30000	260	1. Warfarina: 12 mg / día comenzando 3 días antes de la cirugía
5.	Terminal	70	1. Post-incisión: 10000 2. Antes de soltar las pinzas vasculares: 10000	30000	260	1. Warfarina: 12 mg / día comenzando 3 días antes de la cirugía
6.	Terminal	75	1. Post-incisión: 10000 2. Antes de soltar las pinzas vasculares: 10000	35000	298	1. Warfarina: 12 mg / día comenzando 2 días antes de la cirugía 2. Clexane: 120 mg el día de la cirugía
7.	Recuperación (24 horas)	55	1. Post-incisión: 10000 2. Antes de soltar las pinzas vasculares: 2000	30000	255	1. Warfarina: 12 mg / día comenzando 3 días antes de la cirugía

- 5 En todos los animales se consiguió una anastomosis de extremo a extremo satisfactoria de la arteria y vena desceluladas a la arteria y vena renal del animal receptor. En cinco de siete implantes, la reperusión completa del andamio (incluidas las microconexiones vasculares dentro del intestino descelularizado con la sangre del huésped) se obtuvo dentro de una hora de la implantación (véase la figura 6), y los andamios permanecieron permeables durante la duración de la experimento (tabla 5). Queda el séptimo injerto en vivo durante 24 horas fue patente en el momento de la explotación.
- 10 La figura 6A muestra el implante 1 hora después de la implantación. El segmento derivado del intestino perfundido tiene un aspecto rosado saludable típico de los tejidos vitales perfundidos. La arcada mesentérica muestra una buena perfusión, al igual que el implante intestinal. Las puntas de las flechas apuntan a los vasos mesentéricos libres de coágulos y es visible la perfusión completa de los microvasos en la superficie serosa del segmento intestinal.
- 15 La figura 6B proporciona una vista alternativa del mismo implante 1 hora después de la implantación, con un aumento mayor que el representado en la figura 6A. Las flechas apuntan a microconexiones intestinales con vasos descelularizados distinguibles. La imagen muestra un sistema vascular libre de coágulos y patente con arterias y

venas claramente visibles y perfundidas con la sangre del receptor. Los capilares de la superficie serosa también son claramente visibles, perfundidos y estructuralmente intactos después de la descelularización, como lo demuestra la ausencia de fugas de sangre. El segmento intestinal perfundido tiene un aspecto rosado saludable típico de los tejidos vitales perfundidos.

5 Se obtuvo una reperfusión exitosa de los injertos con sangre sistémica en cinco de los siete casos. En los dos casos fallidos, la reperfusión se evitó mediante la coagulación de los vasos mesentéricos, que tuvo lugar poco después de introducir la sangre sistémica en el andamio. El protocolo más exitoso combinó la premedicación oral de los animales con 12 mg / día de warfarina, el precondicionamiento de la estructura del andamio con 30000U de heparina sódica pura y la infusión intravenosa de 12000 - 20000 U de heparina sódica. Los animales con una ingesta total de heparina (calculada en base al peso corporal y la duración del procedimiento quirúrgico) de 255-260 U/kg/h fueron los que mejor se anticoagularon. Sin embargo, los animales que recibieron 55U/kg/h también tuvieron un resultado satisfactorio con reperfusión completa y permeabilidad de los vasos descelularizados, tal y como se muestra en la tabla 4:

**Tabla 4**

Animal Nº.	Resultado de la implantación			
	Anastomosis exitosa	Reperfusión con sangre	Formación de coágulos	Sangrado excesivo
1.	+	+	-	-
2.	+	-	+	-
3.	+	-	+	-
4.	+	+	-	-
5.	+	+	-	-
6.	+	+	-	+++
7.	+	+	-	+

20 La longitud de la arteria de alimentación descelularizada y la vena de drenaje también contribuyó a determinar si la reperfusión era probable o no, ya que los andamios con vasos más cortos se comportaron mejor (véase la tabla 5).

**Tabla 5**

Animal Nº.	Longitud del pedículo [cm]		Longitud media de los vasos implantados	Heparina total recibida por el animal con respecto a la longitud de los vasos implantados [U / kg / h / cm]
	Arteria	Vena		
1.	1	0,5	0,75	<b>73</b>
2.	3,0	2,5	2,75	<b>30</b>
3.	3,5	2,5	3	<b>17</b>
4.	3	2,35	2,675	<b>30</b>
5.	2	1,95	1,975	<b>131</b>
6.	1,9	1,9	1,9	<b>137</b>
7.	1,95	1,95	1,95	<b>153</b>
8.	2	1,85	1,925	<b>132</b>

30 (b) Análisis histológico e inmunohistoquímico

Después de cada procedimiento de implantación, se extrajeron muestras del andamio, se fijaron y se procesaron

para la histología de rutina. Se usaron secciones teñidas con H&E para evaluar el grado de fuga vascular en el tejido circundante, la velocidad de perfusión y cualquier signo de coagulación dentro de los vasos sanguíneos.

5 Se incorporó tinción inmunohistoquímica para visualizar cualquier célula progenitora endotelial (CD133), actina de músculo liso ( $\alpha$ SMA), macrófagos (CD68) y factor de Von Willebrand (vWF) dentro de los injertos recolectados 1 y 24 horas después de la implantación. Antes de la tinción con IHC, todas las secciones se desparafinaron y rehidrataron y en este punto se llevó a cabo cualquier recuperación de antígeno necesaria. La actividad de peroxidación endógena dentro del tejido se bloqueó usando peroxidasa de hidrógeno al 3% en metanol durante 30 minutos. Se evitó la unión no específica usando suero de caballo normal (Impress Kit, Vector Laboratories, Reino Unido) durante 30 minutos (CD68,  $\alpha$ SMA) y 2 horas (CD133, VWF). Las secciones se incubaron luego con el anticuerpo primario diluido en PBS; para los controles negativos realizados en paralelo, solo se utilizó PBS. Posteriormente, las secciones se lavaron en PBS; Lavados de 3x3 minutos y luego se incubaron adicionalmente con un anticuerpo secundario biotinilado. Esta etapa fue seguida por el kit Vectastain Elite ABC (Vector Laboratories, Reino Unido) y 3 ciclos de 3 minutos con PBS (CD133). La visualización se logró utilizando sustrato de tetracloruro de 3,3-diaminobencidina (DAB) (Vector Laboratories, Reino Unido) y 5 minutos de lavado en agua destilada. Finalmente, las secciones se tiñeron por contraste con hematoxilina de Harris durante 1 minuto, se deshidrataron, se aclararon con xileno y se cubrieron con un cubreobjetos.

20 Todos los datos continuos se expresaron como la media ( $n = 3$ )  $\pm$  Error estándar de la media (SEM por sus siglas en inglés de "*Standard Error of the Mean*") y  $p < 0,05$  se consideró significativo. Los valores  $p$  se estimaron utilizando ANOVA de una vía, y todos los cálculos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 4.

25 El análisis histológico indicó que en cinco de los siete implantes (cuatro estudios a corto y uno a largo plazo) la mayoría de los vasos (incluidos los vasos y capilares intestinales de diámetro pequeño) eran permeables y contenían sangre no coagulada (véase la figura 7A, B). La tinción con elastina de Miller indicó que la coagulación se desencadenó principalmente en lugares donde se interrumpió la pared vascular o la elastina interna.

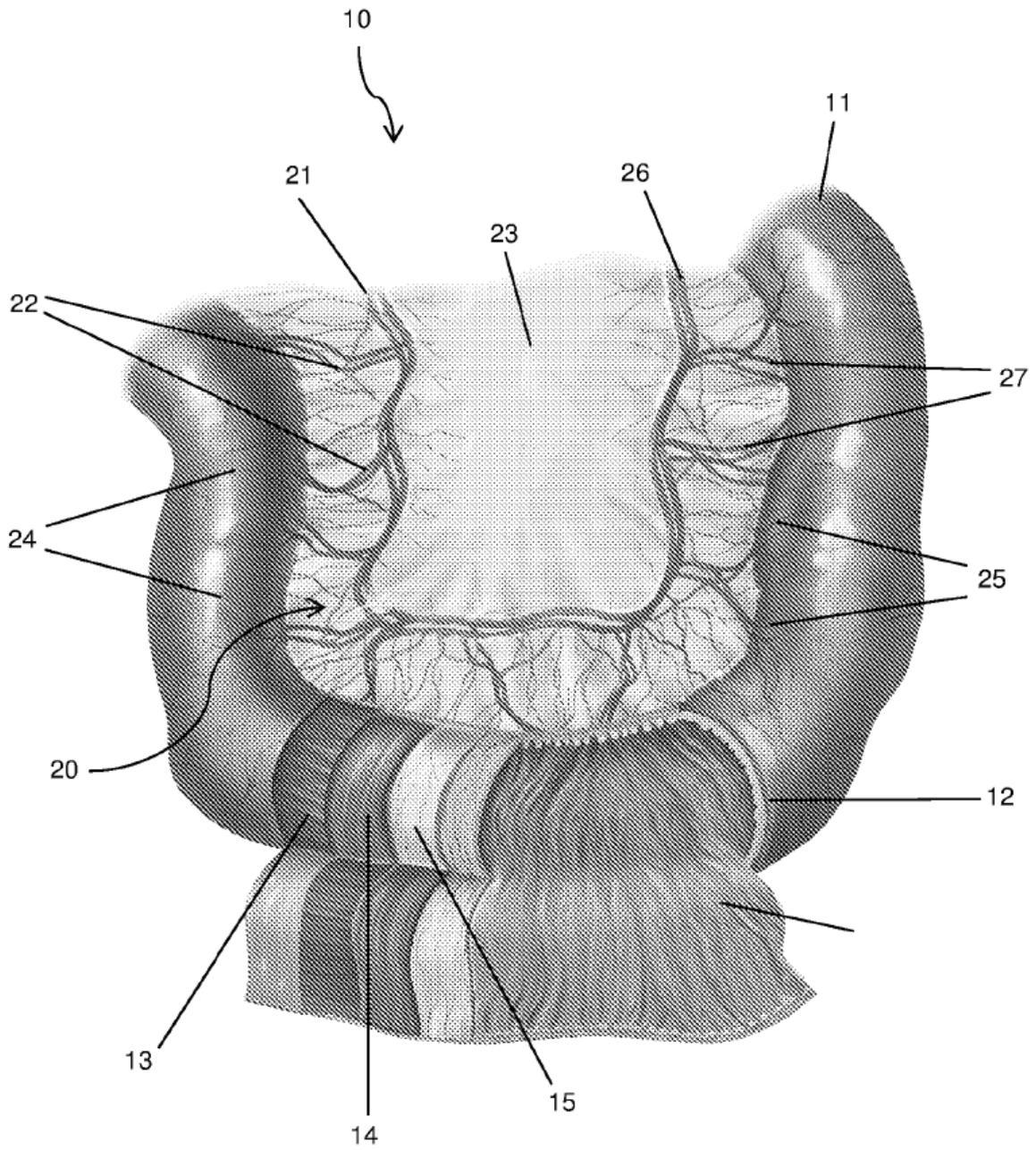
30 Tan pronto como una hora después de la implantación, las células huésped estaban presentes en los vasos acelulares anastomosados de los andamios (figura 8A). La tasa de infiltración celular se redujo en las partes distales del injerto. Sin embargo, las células estaban presentes en la superficie luminal de los vasos mesentéricos. La tasa de infiltración celular de la ECM del andamio fue muy alta a las 24 horas después de su implantación, pero no se pudieron evaluar signos de reacción intensa a cuerpo extraño.

35 La mayoría de las células que se infiltraban desde el lado anastomótico de las arterias a una hora eran CD68+, sin embargo, 24 horas después estaban presentes más macrófagos en la parte distal que en la proximal de los vasos implantados. La mayoría de las células presentes en la arteria principal (pero no en la vena) del injerto implantado durante 24 horas fueron CD68-. Había más macrófagos dentro de las partes libres de coágulos de las construcciones de andamio. Había pocas células CD68+ presentes en los vasos renales del huésped. Algunas de las células que recubren la arteria anastomosada eran CD133+ tan pronto como una hora después de su implantación, y su número aumentó en 24 horas (véase la figura 8B). Las secciones del sitio anastomótico mostraron una cantidad similar de tinción de VWF+ en el pedículo principal del donante y del receptor. Sin embargo, no se detectó tinción cuando se analizaron la arteria y la vena principal descelularizadas no implantadas. No se pudieron ver células  $\alpha$ SMA + en ninguno de los implantes.

45 Por supuesto, se debe entender que no se pretende que la invención esté restringida por los detalles de las realizaciones específicas anteriores, que se proporcionan únicamente a modo de ejemplo.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Procedimiento para producir un implante a partir de tejido intestinal, comprendiendo el tejido intestinal un segmento tubular de intestino con al menos parte de su vasculatura asociada intacta, el procedimiento comprende:
- 10                   perfundir la vasculatura a través de uno de sus vaso con una serie de medios descelularizantes en los que la serie de medios comprende al menos un detergente, al menos una proteasa y al menos una ADNasa; y
- 15                   perfundir por separado el segmento tubular del intestino a través de su lumen con una serie de medios descelularizantes en los que la serie de medios comprende al menos un detergente, al menos una proteasa y al menos una DNasa,
- 20                   en donde la perfusión de la vasculatura se realiza de acuerdo con un primer protocolo de perfusión y la perfusión del segmento tubular del intestino se realiza de acuerdo con un segundo protocolo diferente y en donde el primer y segundo protocolos difieren en sus respectivos medios de descelularización y/o en su cantidad de veces de perfusión.
- 25 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la vasculatura se perfunde a través de una de sus arterias principales y en el que el al menos un medio descelularizante sale de la vasculatura a través de una vena principal.
- 30 3. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que se extraen células del tejido intestinal.
- 35 4. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el primer protocolo de perfusión usa medios descelularizantes diferentes del segundo protocolo de perfusión.
- 40 5. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la perfusión se realiza cabo usando perfusiones en serie de soluciones de SDS, tripsina y DNasa.
6. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que durante la perfusión el tejido intestinal se trata en un medio de incubación o medios que son los mismos que el medio o medios de descelularización utilizados para perfundir el componente vascular del tejido intestinal.
7. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que una o más de las siguientes estructuras se retienen al menos parcialmente en el implante: capa mucosa del componente tubular; capa submucosa del componente tubular; capa serosa del componente tubular; capas musculares circulares y/o longitudinales del componente tubular; túnica adventicia de la vasculatura; túnica media de la vasculatura; túnica íntima de la vasculatura.



**FIG. 1**

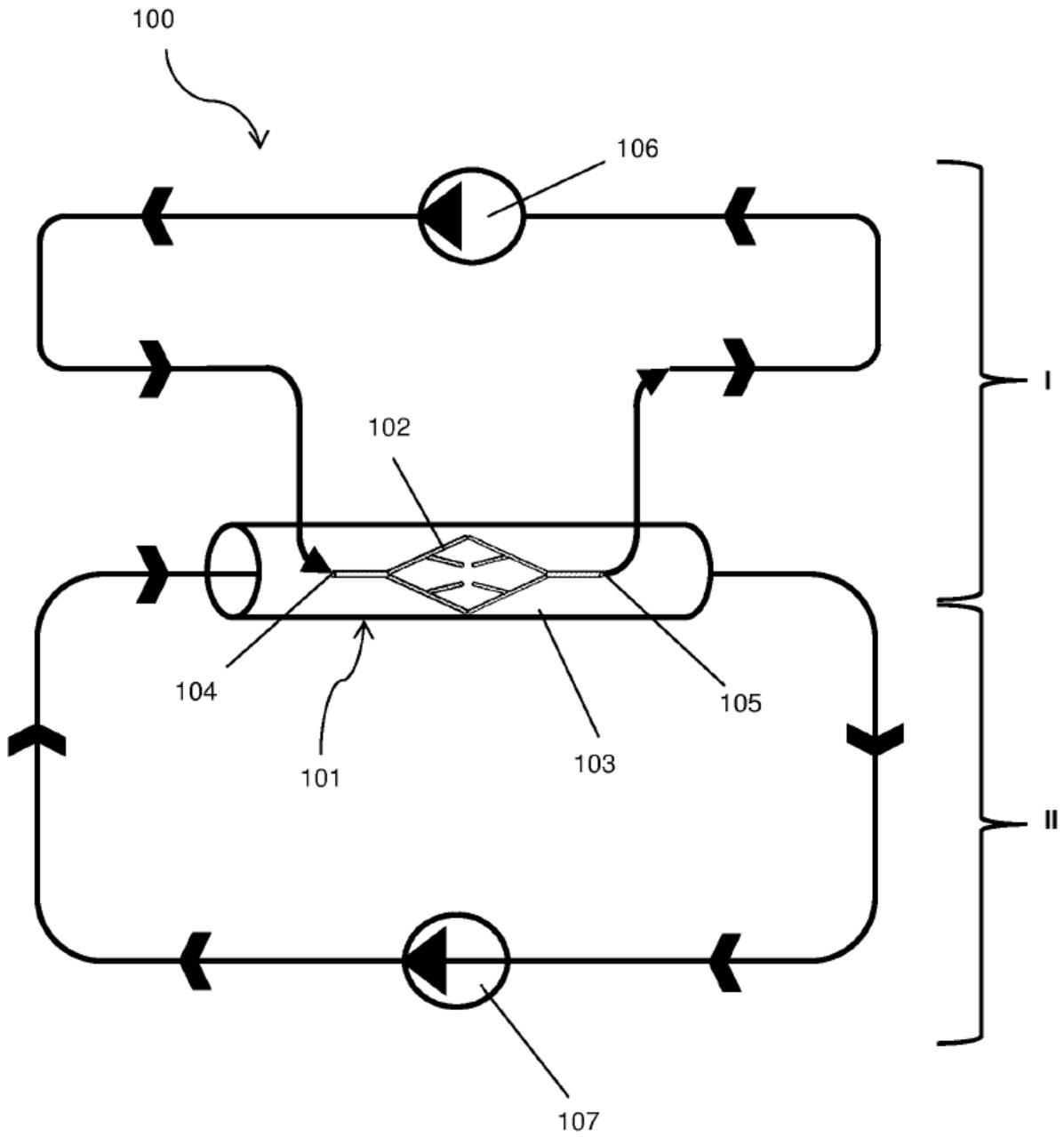
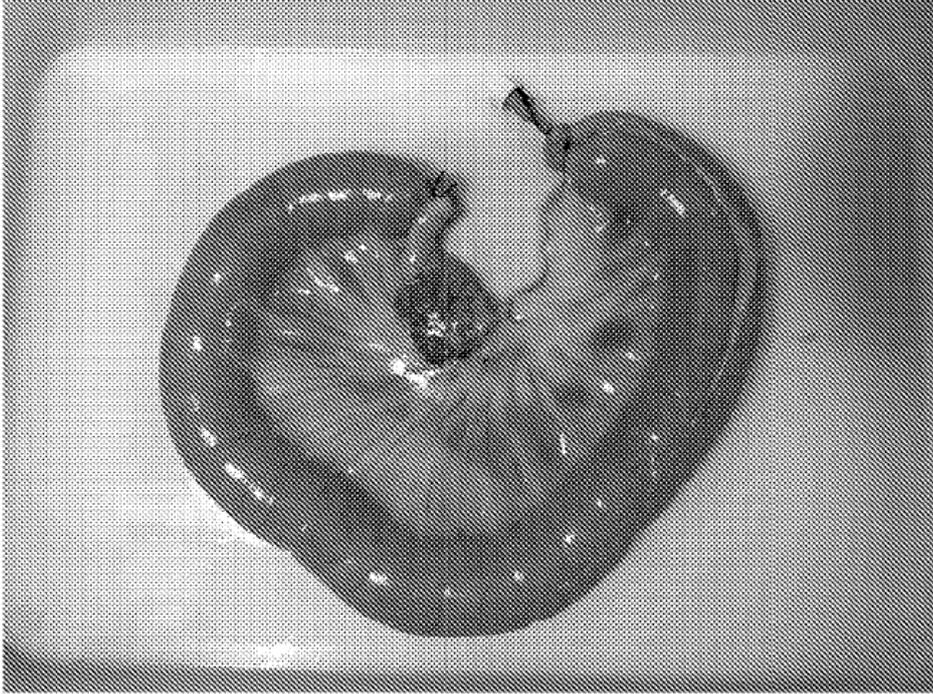
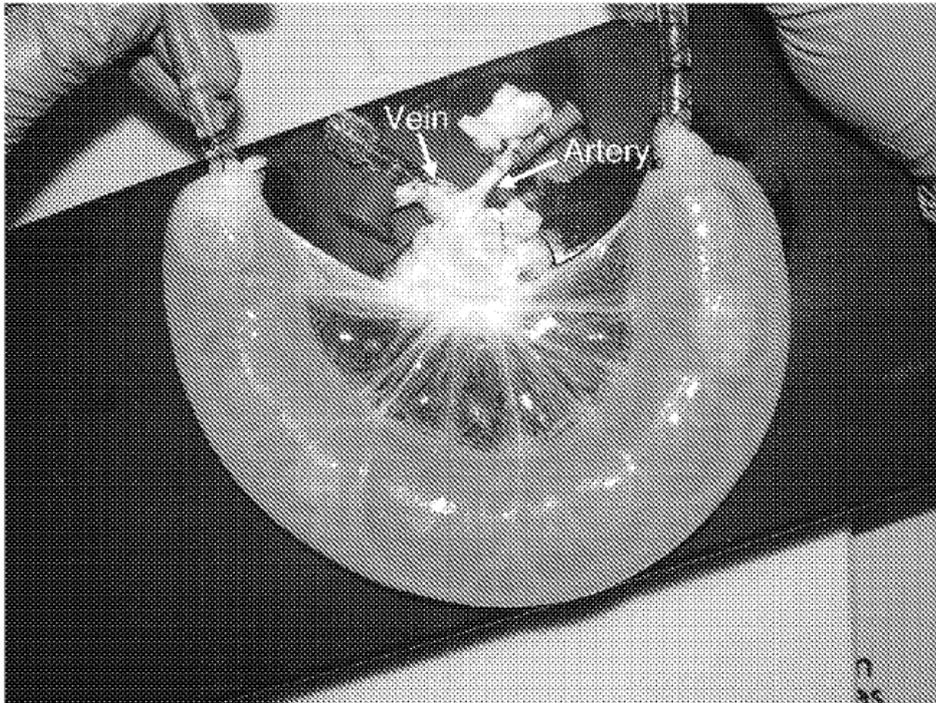


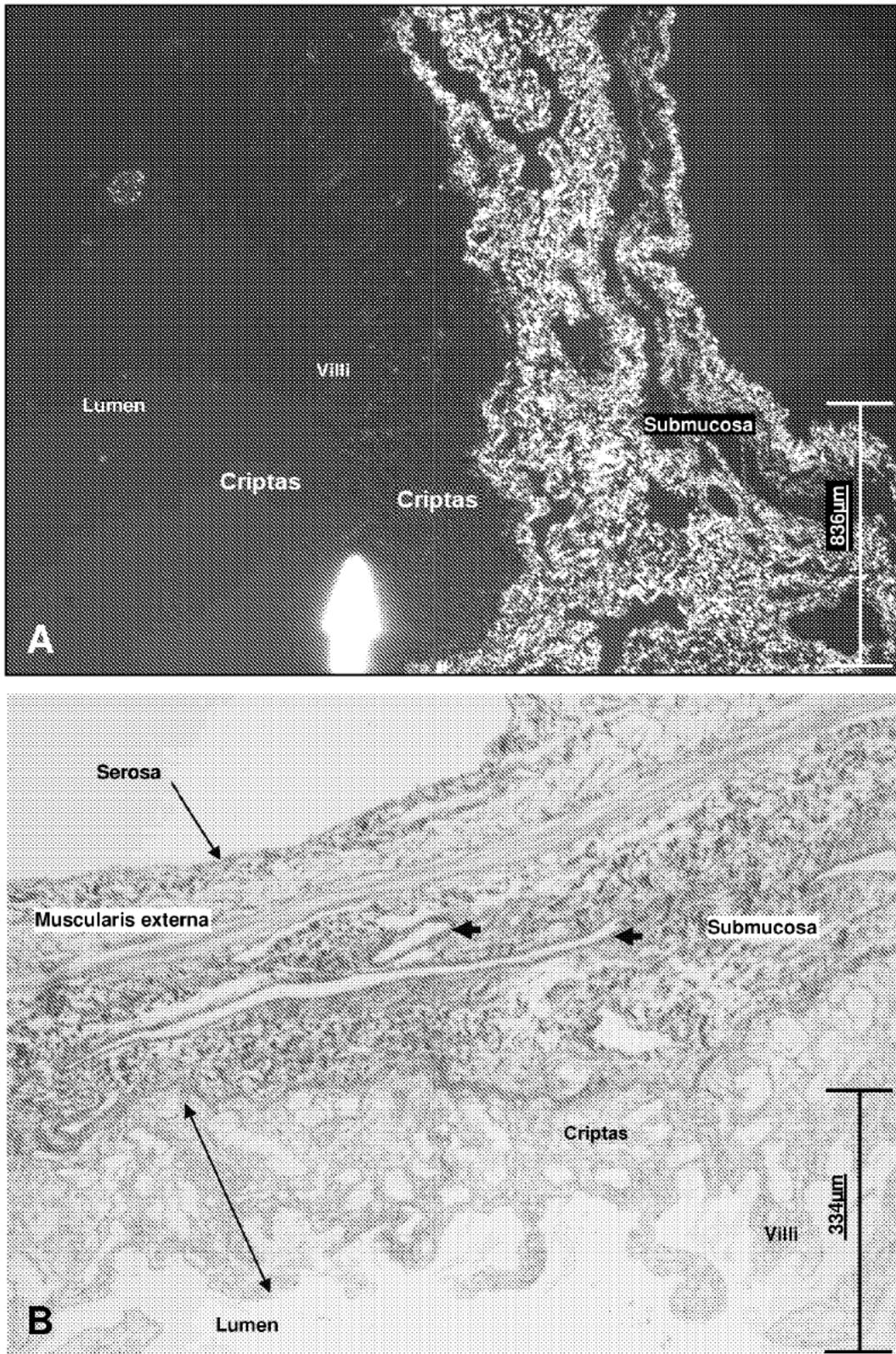
FIG. 2



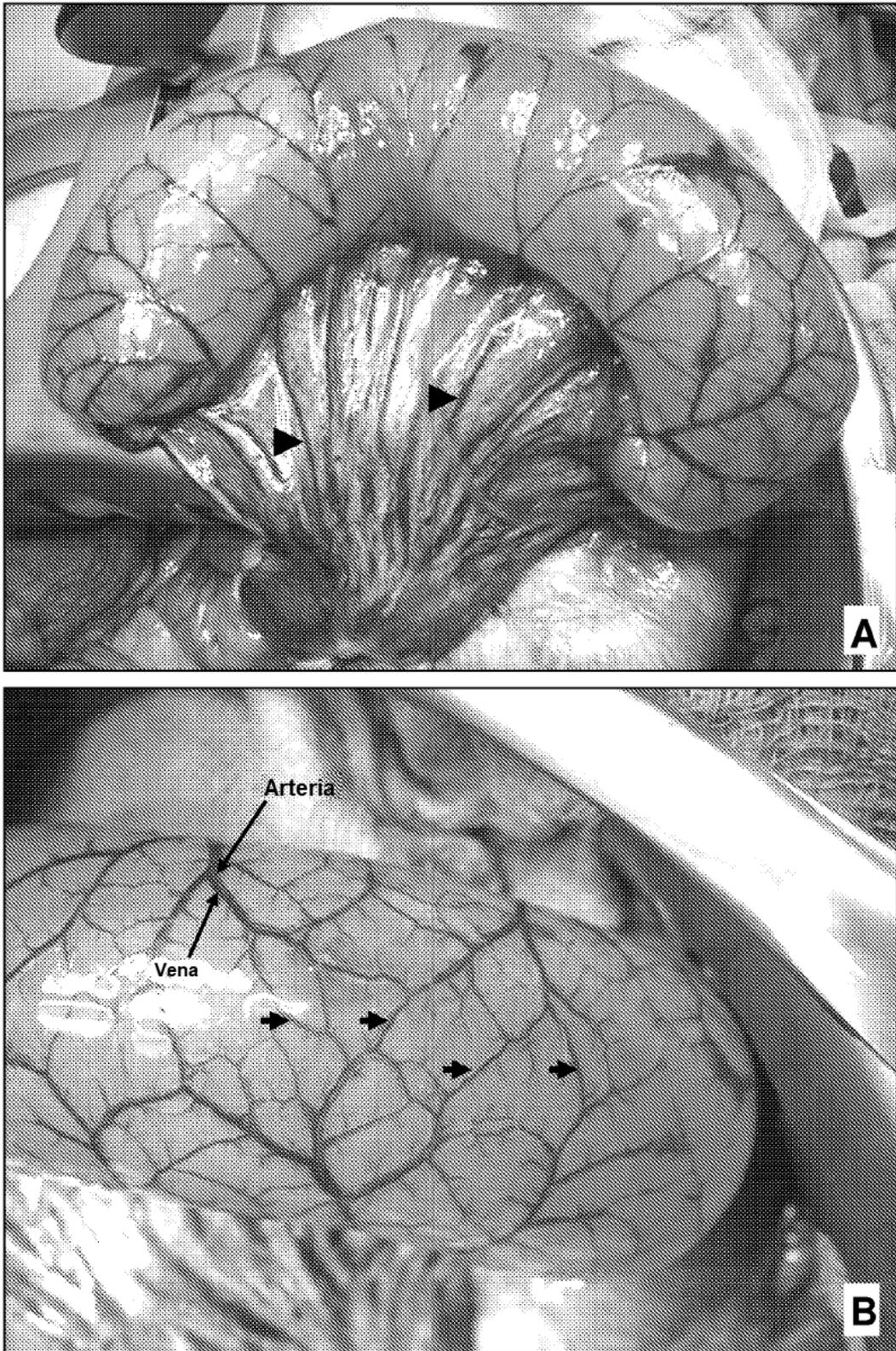
**FIG. 3**



**FIG. 4**



**FIG. 5**



**FIG. 6**

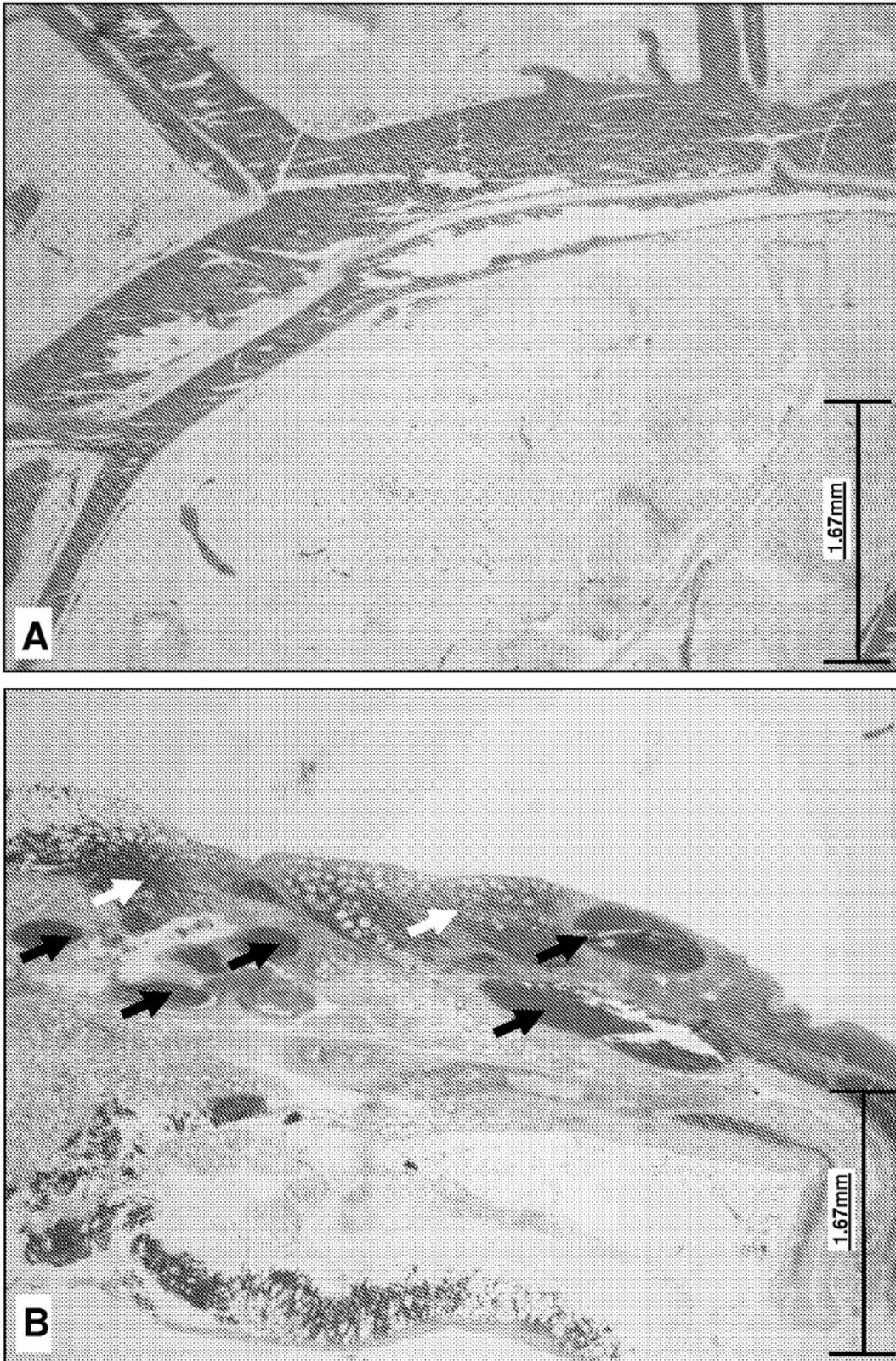


FIG. 7

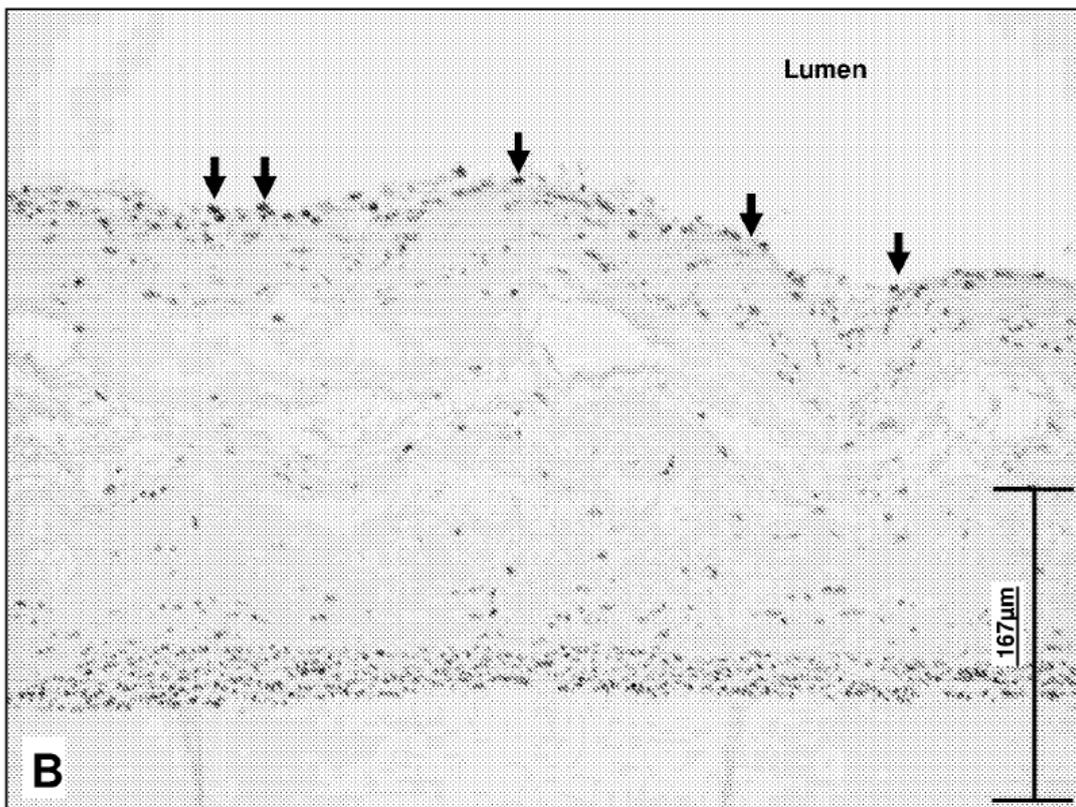
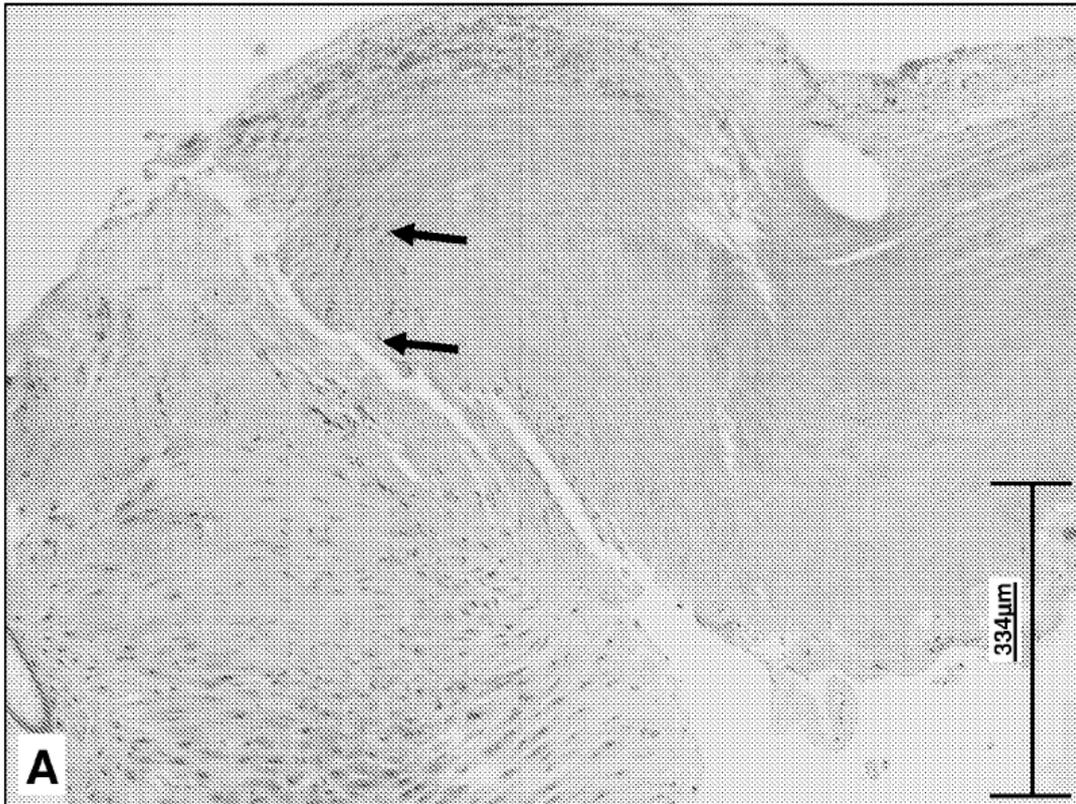


FIG. 8