

INJERTO VASCULAR REGENERATIVO MULTICAPA BASADO EN COLÁGENO, CON RECUBRIMIENTO LUMINAL BIOACTIVO

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al campo general de la ingeniería de tejidos y medicina regenerativa, particularmente a un injerto vascular regenerativo que comprende una matriz porosa multicapa basada en colágeno y un recubrimiento funcional con péptidos proendoteliales y un polímero hidrofílico.

DESCRIPCION DEL ESTADO DEL ARTE

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en todo el mundo, en donde su tratamiento generalmente requiere la sustitución de las arterias enfermas (World Health Organization, “Global status report on noncommunicable diseases” World Health Organization., Geneva, 2010). El reemplazo de vasos sanguíneos ha sido un desafío en la investigación biomédica principalmente debido a su pérdida de permeabilidad a mediano término que suele requerir re-intervenciones quirúrgicas para sustituirlos. Al respecto, el estándar de oro para los vasos de pequeño diámetro es el uso de vasos autólogos, como la vena safena (SV) y la arteria torácica interna (ITA), sin embargo, su extracción no siempre es posible (R. Harskamp, R. Lopes, C. Baisden, R. de Winter and J. Alexander, “Saphenous vein graft failure after coronary artery bypass surgery: pathophysiology, management, and future directions”, Ann Surg, vol. 257, no. 5, pp. 824-833, 2013).

Idealmente, un injerto vascular debería recuperar la función fisiológica del vaso nativo mediante la regeneración del tejido dañado, que incluye, promover y guiar adecuadamente la regeneración tisular, y apoyar el flujo sanguíneo. No obstante, los injertos vasculares comercialmente disponibles son injertos sintéticos hechos de politetrafluoroetileno (PTFE)

y tereftalato de polietileno (PET), que tienen un desempeño ineficaz en la sustitución de vasos de pequeño diámetro. En estas circunstancias, las re-intervenciones son necesarias debido a la pérdida de permeabilidad o deficiencias en la integridad del injerto que, en última instancia, pueden llevar a comprometer el suministro de sangre en el área de interés (S. Pashneh-Tala, S. MacNeil and F. Claeysens, “The Tissue-Engineered Vascular Graft-Past, Present, and Future”, *Tissue Eng Part B Rev*, vol. 22, no. 1, pp. 68-100, 2016).

En este sentido, se han realizado diversos esfuerzos para el desarrollo nuevos tipos de injertos que superen las limitaciones de los injertos vasculares sintéticos no degradables, particularmente la necesidad de re-intervenciones.

Por ejemplo, la solicitud WO2019/023447 divulga un dispositivo de injerto sintético multicapa. El dispositivo comprende una primera matriz polimérica biodegradable y porosa; una capa de gel ECM sobre la primera matriz polimérica biodegradable porosa; y una segunda matriz polimérica biodegradable porosa sobre el gel ECM. Asimismo, divulga el método para fabricar dicho dispositivo, que consiste en depositar una capa de gel ECM sobre una primera matriz polimérica biodegradable, porosa y tubular; y depositar una segunda matriz polimérica biodegradable, porosa y tubular sobre el gel de ECM para producir una estructura tubular.

El artículo “*Biofunctionalized Electrospun PCL-PIBMD/SF Vascular Grafts with PEG and Cell-Adhesive Peptides for Endothelialization*” (Bai, Lingchuan et al. “Biofunctionalized Electrospun PCL-PIBMD/SF Vascular Grafts with PEG and Cell-Adhesive Peptides for Endothelialization.” *Macromolecular bioscience* vol. 19,2 (2019): e1800386. doi:10.1002/mabi.201800386) describe la fabricación de un injerto vascular el cual tiene como fin mejorar la actividad antitrombogénica y la endotelización. Particularmente, el injerto vascular es de pequeño calibre (diámetro 2 mm) fabricado a partir de poli(ϵ -caprolactona)-b-poli(isobutil-morfolina-2,5-diona) (PCL-PIBMD) y fibroína de seda por electrohilado, y luego biofuncionalizado con polietilenglicol (PEG) de baja contaminación y dos secuencias de péptidos adhesivos celulares (CREDVW y CAGW).

Por su parte, en el artículo *“Covalent grafting of PEG and heparin improves biological performance of electrospun vascular grafts for carotid artery replacement”* (Zhu, Tonghe et al. “Covalent grafting of PEG and heparin improves biological performance of electrospun vascular grafts for carotid artery replacement.” *Acta biomaterialia* vol. 119 (2021): 211-224. doi:10.1016/j.actbio.2020.11.013), se describe un injerto tubular electrohilado de bajo calibre a base de poli-(éster-uretano)urea (PEUU) funcionalizado con polietilenglicol (PEG) y heparina a través de injerto covalente. El artículo describe que el injerto PEUU funcionalizado con PEG y heparina (PEUU @ PEG-Hep) tenía propiedades mecánicas comparables con el vaso sanguíneo nativo, y mostraron buena citocompatibilidad y compatibilidad sanguínea.

Si bien en el estado de la técnica se divulgan diferentes injertos vasculares que buscan reducir la necesidad de re-intervenciones y las limitaciones de los injertos comercialmente disponibles, en particular para la sustitución de vasos de pequeño calibre, aún persiste la necesidad de injertos desarrollados a partir de biomateriales adecuados que proporcionen a las células un soporte con integridad estructural y suministro de agentes biológicos, que favorezcan un microambiente específico del tejido vascular para reemplazar el vaso dañado, induzcan la regeneración y restauración de la funcionalidad apropiada del mismo, regulen la respuesta inmune y aceleren los procesos de repoblación celular fisiológica.

Por lo anterior, garantizar una terapia ideal para la regeneración de vasos sanguíneos mediante un producto que promueva una curación rápida, que sea bio-activo y que minimice la necesidad de re-intervenciones quirúrgicas, aun representa un desafío.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un injerto vascular regenerativo que comprende una matriz porosa multicapa cilíndrica basada en colágeno con un recubrimiento funcional con péptidos proendoteliales y un polímero hidrofílico, y a su método de elaboración. El injerto

de la presente invención permite obtener conductos vasculares integrados al tejido nativo dando continuidad al flujo sanguíneo de forma similar a la fisiológica. Esto se logra a partir de la regeneración de la pared vascular sobre un sustrato que responde de manera controlada a la respuesta inflamatoria y opera de manera óptima bajo condiciones hemodinámicamente complejas mientras estimula la formación de un endotelio funcional y la repoblación de dicha matriz.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1A muestra una modalidad de una estructura del injerto vascular regenerativo. Diagrama de un corte transversal de injerto con ampliación de la matriz multicapa y el recubrimiento superficial interno.

FIG. 2 muestra un diagrama de vista lateral de las diferentes conformaciones del injerto vascular para el implante. 2A. conformación en C; 2B. conformación recta; 2C conformación en S; 2D. conformación con bifurcaciones.

FIG. 3 muestra una esquema general de producción de injerto vascular regenerativo basado en vasos sanguíneos de mamífero.

FIG. 4 muestra una esquema general de producción de injerto vascular regenerativo basado en electrohilado de polímeros.

FIG. 5 muestra un diagrama de fases de integración del injerto al tejido nativo. En la parte superior se describen las barreras para la regeneración a través de las diferentes fases de integración de un injerto al tejido nativo y en la parte inferior los mecanismos compensatorios que resultan en regeneración del tejido. Dichas fases de integración son I: Superar la cirugía, II: interactuar con sangre, III: Estabilizar la respuesta inflamatoria, IV: Reendotelializar, V: Remodelar la pared vascular.

FIG. 6A-C muestra una imagen del injerto vascular regenerativo basado en vasos sanguíneos de mamífero (6A). Microscopía electrónica de barrido (SEM) de superficie interna funcionalizada (6B). Histología de sección transversal de del injerto vascular regenerativo basado en vasos sanguíneos de mamífero (6C).

FIG. 7A-D muestra una imagen del injerto vascular regenerativo elaborado por electrohilado de polímeros. Vista lateral (7A) y transversal de injerto multicapa (7B). Sección transversal injerto multicapa en SEM (7C) e histología del injerto multicapa en sección transversal (7D).

FIG. 8A-C muestra unas gráficas de los perfiles de esfuerzo circunferencial de los injertos vasculares regenerativos basados en vasos sanguíneos. Arteria nativa (7A); Arteria decelularizada (7B); e. Injerto vascular (7C).

FIG. 9A-C muestra unas gráficas de los perfiles de esfuerzo circunferencial después de punzonamiento de los injertos vasculares regenerativos basados en vasos sanguíneos. Arteria nativa (7A); Arteria decelularizada (7B); e. Injerto vascular (7C).

FIG. 10A-B muestra unas gráficas de Curvas de estrés – deformación circunferencial para el injerto multicapa comparado con arteria nativa porcina (PCA).

FIG. 11A-C muestra un SEM de superficie arteria decelularizada (11A); SEM de superficie injerto basado en vasos sanguíneos funcionalizado con recubrimiento PEG y péptidos (11B); SEM sección transversal de injerto basado en electrohilado (11C).

FIG. 12A-C muestra una histología de los injertos vasculares basados en vasos sanguíneos (12A) y basados en electrohilado (12B).

FIG. 13A-B muestra una caracterización del diámetro del poro de los injertos vasculares basados en vasos sanguíneos (13A) y basados en electrohilado (13B).

FIG. 14 muestra una prueba de hemólisis en donde se verifica que el injerto vascular regenerativo es hemocompatible y en donde las siglas significan: PRP: Plasma rico en plaquetas, Eph. Epinefrina, PTFE: Injerto comercialmente disponible en PTFE, DF: Arteria porcina decelularizada funcionalizada (TEVG Biológico 100A), D: Arteria porcina decelularizada, P: PEUU y Gelatina, PF: PEEUU y Gelatina Funcionalizado.

FIG. 15 muestra una prueba de LDH (enzima lactate dehydrogenase) como indicador de activación plaquetaria en la superficie del injerto, mostrando que las funcionalizaciones reducen la probabilidad de formación de trombos. PRP: Plasma rico en plaquetas, Eph. Epinefrina, PTFE: Injerto comercialmente disponible en PTFE, DF: Arteria porcina decelularizada funcionalizada, D: Arteria porcina decelularizada, P: PEUU y Gelatina, PF: PEEUU y Gelatina Funcionalizado.

FIG. 16A-B muestra unas gráficas de los indicadores de crecimiento de células proendoteliales (HUVECs) en biomateriales, en la que se compara la efectividad de proliferación celular al incluir diferentes mezclas de péptidos proendoteliales al tratamiento superficial. Densidad celular a las 24h de siembra de HUVECs sobre la superficie de arteria funcionalizada CA: Arteria carótida decelularizada; A, B, C, D: mezclas de péptidos adhesivos (MEZCLA A: RGD; B:RGD y YIGSR; C:RGD y IKVAV; D: RGD y SKVVLGR) (16A). Porcentaje de viabilidad obtenido tras 24 de exposición directa a injertos de PEUU: Gelatina. MC: Multicapa (funcionalizado con péptidos proendoteliales), PEUU: polímero base, PET: Injerto comercial de dacron. PTFE: Injerto comercial de teflón (16B).

FIG. 17 muestra una expresión de genes de función endotelial, mostrando modulación de la expresión genética que previene agregación plaquetaria y promueve

maduración endotelial para los injertos funcionalizados con péptidos proendoteliales A, B, C, D: mezclas de péptidos adhesivos (MEZCLA A: RGD; B:RGD y YIGSR; C:RGD y IKVAV; D: RGD y SKVVLGR).

FIG. 18 muestra imágenes de una cirugía para la evaluación in vivo de los injertos vasculares. Animal en preparación para cirugía de implantación de injerto en aorta abdominal (18A); injerto anastomosado a aorta abdominal con flujo (18B), injerto permeable (sin trombo) tras necropsia (18C).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención corresponde a un injerto vascular regenerativo que comprende una matriz porosa multicapa cilíndrica basada en colágeno con un recubrimiento funcional con péptidos proendoteliales y un polímero hidrofílico, el cual promueve la recuperación y la función fisiológica de vasos sanguíneos nativos dañados mediante la regeneración del tejido vascular.

Asimismo la presente invención se refiere a un método para elaborar el injerto vascular regenerativo.

Para propósitos de interpretar esta descripción, se debe tener en cuenta el significado usual en el campo técnico de los términos acá incorporados, a menos que se incorpore una definición particular o el contexto indique claramente lo contrario. De manera particular, se aplicarán las siguientes definiciones y cuando sea apropiado, los términos utilizados en forma singular también incluirán la forma plural.

Injerto: construcción o estructura formada por un material vivo o no, biológico o sintético, que proporciona un soporte físico que reemplaza a un tejido lesionado, que debería ser similar a la estructura del tejido reemplazado. En la presente invención, los injertos son injertos vasculares, es decir injertos que reemplazan un vaso lesionado y promueven su regeneración.

Injerto regenerativo: es un injerto que posee una o más moléculas, sustancias o células que simulan las condiciones naturales *in vivo* del tejido reemplazado y que promueve su regeneración.

Polímero: es una macromolécula formada por la unión mediante enlaces covalentes de unidades estructurales pequeñas, conocidas como monómeros. Para efectos de la presente invención los polímeros son biodegradables, es decir, que son susceptibles a la degradación química, bioquímica o microbiana en el ambiente biológico del implante. Los ejemplos de polímeros biodegradables aquí utilizados para la generación de injertos se caracterizan por su biocompatibilidad, pueden ser de origen natural, por ejemplo, sin limitarse a colágeno, gelatina tipo A, elastina, quitosano, ácido hialurónico o sintéticos como poli(éster-uretano)urea (PEUU), policaprolactona (PCL), polihidroxialcanoatos (PHA) y poli(lactida- glicolida) (PLGA), entre otros.

Colágeno (COL): biomaterial natural de tipo proteína compuesto por tres cadenas que forman una triple hélice, cuyas propiedades mecánicas, químicas y biológicas, comprenden su gran estabilidad, elevada fuerza tensora, extensibilidad, formación de agregados moleculares, retención de agua, capacidad para formar enlaces de entrecruzamiento, degradación por colagenasas, reabsorción tisular, semipermeabilidad, interacción con diferentes moléculas, antigenicidad reducida, favorece la adhesión celular, interacciona con plaquetas y produce la activación de los componentes del sistema de coagulación sanguínea.

Decelularización: proceso para aislar la matriz extracelular (ECM) del tejido de las células que lo habitan y del contenido genético presente en dicha matriz, dejando un andamio de ECM del tejido original con el propósito de evitar la activación la respuesta inmune de los pacientes que reciben implantes basados en este material. El proceso de decelularización se lleva a cabo mediante la aplicación de tratamientos físicos, como temperatura, presión y disrupción eléctrica, tratamientos químicos, tratamientos enzimáticos o combinaciones de los anteriores.

Electrohilado: técnica para elaborar fibras ultrafinas a partir de polímeros naturales y sintéticos que tienen diámetros que van desde tamaños submicrométricos a escalas nanométricas. En el proceso de electrohilado, la solución polimérica es sometida a un campo eléctrico hasta un valor crítico, donde las fuerzas eléctricas repulsivas superan las fuerzas de tensión superficial generando la evaporación del solvente y colectando únicamente una fibra de polímero.

Injerto vascular regenerativo

La presente invención está dirigida a un injerto vascular regenerativo que comprende una matriz porosa multicapa cilíndrica basada en colágeno con un recubrimiento funcional con péptidos proendoteliales y un polímero hidrofílico. La Figura 1 ilustra un esquema general de los injertos de la invención.

Las dimensiones del injerto vascular regenerativo de la invención dependen del tamaño y calibre del vaso lesionado a reemplazar. Típicamente, el injerto puede tener una longitud entre 20mm y 20cm, un diámetro externo entre 2mm y 30mm, preferiblemente entre 2mm y 6mm, y un diámetro interno entre 2mm y 25mm, según el espesor de la pared, en donde para vasos de mayor diámetro el espesor de la pared será mayor

Además, el injerto vascular regenerativo de la invención puede tomar la forma de cualquier vaso del cuerpo (Figura 2). Las formas están asociadas a las tipologías de conexiones entre vasos sanguíneos y en la forma en la que se implanta al árbol vascular y pueden ser encontradas en libros de anatomía y en libros que describan las técnicas quirúrgicas vasculares. Por ejemplo, para fistulas arterovenosas las anastomosis pueden ser latero-laterales y dar al injerto una conformación en “C” para la mezcla de los flujos. Por otra parte, para reemplazos de vasos rectos, el injerto puede estar unido al vaso nativo a través de anastomosis termino-terminales que resulten en que el injerto vascular regenerativo

toma forma de cilindro recto. Para otro tipo de conexiones (como conexiones en cardiopatías congénitas) el injerto puede tener anastomosis latero-terminales, latero-laterales o termino-terminales dando al injerto la posibilidad de asumir la geometría según la región anatómica a intervenir.

El injerto vascular regenerativo de la invención comprende una estructura tubular multicapa porosa biodegradable basada en colágeno conformada por al menos una capa externa y una capa interna; con un recubrimiento polimérico funcionalizado con al menos un péptido conjugado, que se ubica en una superficie interior de la estructura tubular.

Estructura multicapa

Para efectos de la presente invención, multicapa hace referencia a que el injerto vascular comprende más de una capa dispuesta una sobre la otra, en donde las capas están en una disposición concéntrica que forma la estructura tubular. El injerto vascular de la invención se caracteriza porque las capas que conforman la estructura son porosas, y su disposición forma un gradiente de porosidad, en donde la capa externa de la estructura tubular es más porosa que la capa interna.

En una modalidad, la estructura multicapa del injerto vascular de la invención consta únicamente de dos capas, una capa interna y una capa externa. En otras modalidades, la estructura multicapa del injerto vascular de la invención tiene más de dos capas, por ejemplo, tres capas, cuatro capas, cinco capas o seis capas, en donde hay una capa externa, una capa interna y una o más capas intermedias. En todos los casos, cada capa tiene una porosidad específica, que permite mantener el gradiente de porosidad, en donde la porosidad aumenta hacia el exterior de la estructura multicapa.

Característicamente, la capa externa tiene un porcentaje de porosidad entre 30% y 65%, de preferencia 60%, con un diámetro de poro promedio entre 55 μ m y 23 μ m, de preferencia 37 μ m y la capa interna tiene un porcentaje de porosidad entre 1% y 10%, de preferencia

1%, con un diámetro de poro promedio entre 6µm y 18µm, de preferencia 10 µm. En las modalidades donde existen una o más capas intermedias, ellas tienen un porcentaje de porosidad intermedio entre la capa interna y la capa externa. Las capas intermedias podrán tener un porcentaje de porosidad entre 20% y 60%, y un diámetro de poro entre 13 µm y 30 µm,. Todas las porosidades son medidas a partir del análisis de imagen de las histologías correspondientes.

Característicamente, el grosor de las capas dependerá del diámetro del vaso y del sitio de implante objetivo, en donde para el reemplazo de arterias bajo flujos a altas presiones, la capa media será prominente en su espesor con respecto a las capas interna y externa, mientras que para arterias de menos diámetro estas serán más homogéneas.

En una modalidad preferida, la estructura tubular multicapa porosa biodegradable basada en colágeno del injerto vascular regenerativo se construye a partir de un vaso sanguíneo decelularizado. Para efectos de la presente invención, el vaso sanguíneo es seleccionado entre arterias, capilares y venas de mamífero. Preferiblemente, el vaso sanguíneo es una arteria seleccionada entre arteria coronaria, arteria carótida, arteria femoral, o aórtica, entre otros.

Asimismo, los vasos pueden ser de origen humano o de otras especies de mamíferos. Cuando el vaso es de origen diferente a humano, se denomina xenogénico. En una modalidad particular, el vaso sanguíneo es xenogénico de origen porcino, bovino u ovino. En una modalidad preferida, el vaso sanguíneo es una arteria de origen porcino.

Para esta modalidad, la capa externa tiene un porcentaje de porosidad entre 50% y 65%, de preferencia 60%, con un diámetro de poro promedio entre 55µm y 23µm, de preferencia 37µm y la capa interna tiene un porcentaje de porosidad entre 1% y 10%, de preferencia 1%, con un diámetro de poro promedio entre 10µm y 18µm, de preferencia 13 µm. En las modalidades donde existen una o más capas intermedias, ellas tienen un porcentaje de porosidad intermedio entre la capa interna y la capa externa. Las capas intermedias podrán

tener un porcentaje de porosidad entre 40% y 60%, y un diámetro de poro entre 13 μm y 30 μm . Todas las porosidades son medidas a partir del análisis de imagen de las histologías correspondientes.

En otra modalidad preferida, la estructura tubular multicapa porosa biodegradable basada en colágeno del injerto vascular regenerativo de la invención, se elabora mediante electrohilado utilizando al menos dos polímeros biodegradables o de origen biológico.

En este sentido, la estructura tubular multicapa porosa biodegradable basada en colágeno del injerto vascular regenerativo de la invención comprende, al menos, un primer polímero modificado para la adición de grupos carboxilo (P1) y un segundo polímero biodegradable (P2).

Para efectos de la presente invención, el primer polímero se selecciona de poli(éster-uretano)urea (PEUU), policaprolactona (PCL) y polihidroxialcanoatos (PHA), de preferencia PEUU o PCL, y el segundo polímero es colágeno seleccionado entre gelatina tipo A, colágeno hidrolizado, solución de colágeno de origen animal (e.g. cola de rata), de preferencia gelatina tipo A

En la presente invención, los polímeros se mezclan en diferentes proporciones para cada capa, por ejemplo, P1:P2 entre 100:0 y 60:40, lo que genera un gradiente de concentración de cada polímero que contribuye a su vez a mantener el gradiente de porosidad.

De este modo, la concentración de polímero 1: polímero 2 (P1:P2) en la capa externa es entre 92:8 y 98:2, de preferencia 95:5, y en la capa interna es entre 72:28 y 78:22, de preferencia 75:25. En los casos donde existe una o más capas intermedias, en una de ellas la concentración de P1:P2, es entre 82:18 y 88:12, de preferencia 85:15.

En una modalidad, la estructura tubular multicapa porosa está elaborada mediante electrohilado de una mezcla de P1:P2, y comprende tres capas, en donde la relación P1:P2 en la capa interna es de 75:25, en la capa media es de 85:15, y en la capa externa es de 95:5. Para esta modalidad, la capa externa tiene un porcentaje de porosidad entre 30% y 50%, de preferencia 38%, con un diámetro de poro promedio entre 45µm y 30µm, de preferencia 37µm y la capa interna tiene un porcentaje de porosidad entre 3% y 7%, de preferencia 4,5%, con un diámetro de poro promedio entre 7µm y 10µm, de preferencia 9 µm. En las modalidades donde existen una o más capas intermedias, ellas tienen un porcentaje de porosidad intermedio entre la capa interna y la capa externa. Las capas intermedias podrán tener un porcentaje de porosidad entre 17% y 45%, y un diámetro de poro entre 13 µm y 30 µm,. Todas las porosidades son medidas a partir del análisis de imagen de las histologías correspondientes.

Recubrimiento polimérico funcionalizado conjugado a péptidos

En la presente invención, la superficie interna de la capa interna de la estructura tubular multicapa porosa del injerto vascular, conforma el lumen del injerto vascular. Esta superficie está recubierta con un polímero hidrofílico funcionalizado y conjugado a uno o más péptidos proendoteliales.

En un primer aspecto, el polímero hidrofílico que recubre la superficie de la capa interna puede ser polietilenglicol (PEG), más particularmente PEG de cuatro brazos de alto peso molecular, por ejemplo de 20 kDa, 10kDa o 5kDa, de preferencia 20kDa. El polímero está funcionalizado con terminales que permiten la conjugación a uno o más péptidos y la interacción activa con el sistema biológico. Esta funcionalización hace referencia a que la superficie del polímero hidrofílico está modificado con grupos funcionales o sustancias seleccionadas entre grupos amina, norborneno y grupos carboxilo.

Para efectos de la presente invención, la modificación del polímero hidrofílico se realiza por técnicas conocidas en el campo técnico, que incluyen la oxidación, la conjugación covalente de grupos funcionales a través de enlaces peptídicos, y/o la amidación entre otras.

En una modalidad particular, el recubrimiento polimérico es de PEG-carboxilo-norboneno (PEG funcionalizado con norboneno y grupos carboxilo). En otra modalidad preferida, el recubrimiento polimérico es de PEG-amina (PEG funcionalizado con grupos amina).

Una vez el polímero hidrofílico es funcionalizado con los terminales de grupos funcionales, se conjuga a uno o más péptidos proendoteliales. Particularmente se denominan péptidos proendoteliales, que tienen la capacidad de estimular la adhesión y/o la maduración de células proendoteliales para la conformación de un endotelio funcional.

En la presente invención, el polímero hidrofílico funcionalizado está conjugado a uno o más péptidos seleccionados entre péptidos de adhesión, péptidos de maduración endotelial y combinaciones de los mismos. Asimismo, los péptidos de adhesión se seleccionan entre RGD, RGDSPGRCG, GRGDSP, REDV y los péptidos con potencial para favorecer la maduración endotelial se seleccionan entre SVVYGLR, SVVYGLRGERCG, IKVAV, YIGSR, PDSGR, CAG.

En una modalidad preferida, el injerto vascular regenerativo está fabricado a partir de una arteria porcina decelularizada con un recubrimiento interno con PEG de cuatro brazos y alto peso molecular funcionalizado en la forma-PEG-norborneno y conjugado a los péptidos RGDSPGRCG y SVVYGLRGERCG.

En una modalidad preferida, el injerto vascular regenerativo tiene una estructura tubular multicapa porosa fabricada mediante electrohilado de una mezcla de PEUU o PCL y gelatina tipo A, recubierta con PEG de cuatro brazos y alto peso molecular funcionalizado con terminales amina y conjugado a los péptidos RGDSPGRCG y SVVYGLRGERCG.

Método de producción del injerto vascular regenerativo

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona métodos para producir los injertos vasculares regenerativos de la invención. Particularmente, se proporciona un método para producir un injerto vascular regenerativo a partir de un vaso de mamífero y un método para producir un injerto vascular regenerativo elaborado mediante electrohilado de mezclas de polímeros.

Injerto vascular regenerativo a partir de un vaso de mamífero decelularizado

En una primera modalidad, el injerto vascular regenerativo se produce a partir de un vaso de mamífero. De manera general, este método comprende a) decelularizar un vaso sanguíneo de mamífero; b) recubrir el vaso sanguíneo decelularizado de la etapa a) con un recubrimiento polimérico; y c) funcionalizar el recubrimiento polimérico del vaso sanguíneo decelularizado de la etapa b) con péptidos conjugados para obtener un injerto vascular regenerativo. La fabricación de injertos vasculares regenerativos mediante este método requiere mantener condiciones de completa esterilidad, por lo cual las etapas descritas deben realizarse preferiblemente en cabina de flujo laminar de clase II

Opcionalmente, el método de la invención comprende una etapa adicional previa que es la preparación del vaso sanguíneo. Un esquema general del método se ilustra en la Figura 3.

a) Preparación del vaso sanguíneo

En primer lugar, los órganos utilizados para la extracción y preparación de vasos sanguíneos, deben proceder de mamíferos sanos y los órganos deben conservar su estructura intacta. Además, esta primera etapa debe llevarse a cabo antes de que se cumplan 24 horas desde el sacrificio del animal.

El órgano debe lavarse con abundante agua para remover residuos, sangre y coágulos. A continuación, se deben identificar los potenciales vasos de interés en el órgano, se diseccionan las regiones del órgano que contienen los vasos de interés y se separa (de manera gruesa) el tejido circundante de cada vaso. Una vez aislado el vaso, se corta del resto del órgano de acuerdo a la longitud deseada para el injerto.

Una vez se obtiene el vaso de interés, se debe sumergir en agua a temperatura entre 4°C y 20°C durante entre 1 h 4h, hasta que se desprenda el tejido conectivo. A continuación, se procede a aislar el tubo vascular. Para ello, se debe remover la grasa y el tejido circundante cuidando no dañar el vaso sanguíneo. Este proceso se lleva a cabo usando elementos de disección. Posteriormente, para garantizar la total remoción de residuos, se debe llevar a cabo un ciclo de agitación orbital en agua tipo II a temperatura entre 4°C y 10°C durante 5 a 15 minutos. El ciclo debe repetirse mínimo 3 veces cambiando el agua de lavado, o hasta que no se observen residuos en el agua después del ciclo de agitación.

Opcionalmente, en los casos en que el vaso no sea procesado inmediatamente, este debe almacenarse en una solución hipotónica estéril seleccionada entre tampón fosfato-salino (PBS) o solución salina estéril a temperatura entre 4°C y 10°C. Estas condiciones permiten mantener la viabilidad del vaso hasta por 15 días.

b) Decelularización

Una vez se obtiene el vaso limpio, se procede a decelularizar el tejido. Para efectos de la presente invención, Se considera que un vaso sanguíneo ha sido decelularizado de manera efectiva cuando no contiene concentración de ADN y células que causen respuesta inmune en el huésped, esto implica que no se observen núcleos en las imágenes histológicas después de la decelularización y que el conteo de ADN remanente sea menor a 50 ng de dsDNA/mg de tejido deshidratado y fragmentos de ADN menores a 200bps.

La decelularización se lleva a cabo mediante ciclos que combinan métodos físicos, químicos y enzimáticos de remoción de células. Los métodos físicos para la remoción de células incluyen, pero no se limitan a disrupción mecánica, por ejemplo mediante ultrasonificación, centrifugación, agitación, flujo a alta presión, liofilización y ciclos de congelamiento y descongelamiento. Los métodos químicos para la remoción de células incluyen, pero no se limitan a tratamiento con detergentes orgánicos iónicos, tratamiento con detergentes orgánicos no iónicos, tratamiento con ácidos y bases, y tratamientos enzimáticos.

Para efectos de la presente invención, se deben realizar al menos tres ciclos de decelularización, aunque pueden realizarse ciclos adicionales, si tras tres ciclos, el tejido no cumple los criterios de decelularización establecidos. Particularmente, cada ciclo comprende al menos un tratamiento físico, un tratamiento químico o un tratamiento enzimático. De manera preferida, cada ciclo comprende un tratamiento físico, un tratamiento químico y un tratamiento enzimático.

En una modalidad, el tratamiento físico es ultrasonificación y flujo recirculante de líquido para remover las células. Particularmente, el vaso limpio es sumergido en PBS u otra solución tamponada que mantenga el pH alrededor de 7.4 +/- 0,4, en un recipiente cerrado, y sometido a ultrasonificación manteniendo temperaturas entre 10°C y 25°C durante 10 a 30 minutos, preferiblemente durante 15 minutos.

En una modalidad, el tratamiento químico es lavado con detergentes orgánicos iónicos y detergentes orgánicos no iónicos. Ejemplos de detergentes iónicos incluyen, pero no se limitan a dodecil sulfato de sodio (SDS) Ejemplos de detergentes no iónicos incluyen, pero no se limitan a tritón 100.

Para efectos de esta invención, los detergentes utilizados en los ciclos de decelularización se usan a una concentración entre 0,05% y 2,0% p/v, de preferencia al 1,0% p/v diluidos en agua tipo I. En la presente invención, los vasos sanguíneos son sometidos a al menos un

lavado con un detergente iónico, con un detergente no iónico o combinaciones de los mismos en cada ciclo de decelularización. Cada tratamiento con detergente se realiza a temperatura entre 4°C y 25°C durante 10 minutos a 6 horas.

En algunos casos, el detergente puede ser utilizado en combinación con un método enzimático, particularmente con una DNAsa a una concentración entre 1 a 5 unidades de actividad enzimática (U) por vaso.

Cada ciclo de decelularización está conformado por sub-ciclos que comprenden tratamientos físicos, tratamientos químicos, tratamientos enzimáticos y lavados. Particularmente, cada sub-ciclo consiste en un tratamiento físico, un tratamiento químico y al menos un lavado, o de un tratamiento físico, un tratamiento químico, un tratamiento enzimático y un lavado. De manera preferida, en cada sub-ciclo se realiza primero el tratamiento físico, posteriormente el tratamiento químico/enzimático y finalmente el lavado con agua tipo I.

Además, una vez finalizados los ciclos de decelularización, se realizan lavados con agua tipo I hasta remover todos los residuos químicos del vaso decelularizado, y a continuación, se realiza un lavado adicional con PBS u otra solución tamponada que restaure el pH a valores de 7.4 durante 1h a 3h, preferiblemente durante 2h.

En una modalidad preferida, un ciclo de decelularización comprende tres sub-ciclos.

En una modalidad, en un sub-ciclo se somete el vaso sanguíneo limpio a ultrasonificación. A continuación, se sumerge el vaso sanguíneo en una mezcla de al menos un detergente orgánico iónico, preferiblemente SDS a una concentración entre 0,05% y 2,0% p/v, de preferencia 1,0% p/v, y DNAsa 1 a 5 (U), preferiblemente 2 (U) y se agita entre 100 RPM y 300 RPMS durante 2h a 4h, preferiblemente a 200RPM durante 2h. Finalmente, se realizan lavados con agua tipo I hasta remover la totalidad de detergente, particularmente

durante 15 minutos a 1h, de preferencia durante 30 minutos. En una modalidad particular, este es el primer sub-ciclo de un ciclo de decelularización.

En una modalidad, en un sub-ciclo se somete el vaso sanguíneo limpio a ultrasonificación. A continuación, se sumerge el vaso sanguíneo en al menos un detergente orgánico iónico, preferiblemente SDS a una concentración entre 0,05% y 2,0% p/v, de preferencia 1,0% p/v, durante 2h a 5h, y se agita entre 100RM y 300RPM, preferiblemente a 200 RPM durante 4h. Finalmente, se realizan lavados con agua tipo I hasta remover la totalidad de detergente, particularmente durante 15 minutos a 1h, de preferencia durante 30 minutos. En una modalidad particular, este es el segundo sub-ciclo de un ciclo de decelularización.

En una modalidad, en un sub-ciclo se somete el vaso sanguíneo limpio a ultrasonificación. A continuación, se sumerge el vaso sanguíneo en al menos un detergente orgánico no iónico, preferiblemente Triton 100X a una concentración entre 0,05% y 2,0% p/v, de preferencia 1,0% p/v, durante 30 minutos a 2h, y se agita entre 100RPM y 200RPM preferiblemente a 200RPM durante 1h. Finalmente, se realizan lavados con agua tipo I hasta remover la totalidad de detergente, particularmente durante 15 minutos a 1h, de preferencia durante 30 minutos. En una modalidad particular, este es el tercer sub-ciclo de un ciclo de decelularización.

Para efectos de la presente invención, el montaje del sistema donde se realizan los tratamientos físicos y los lavados dependen del tamaño del vaso sanguíneo. Particularmente, cuando el vaso sanguíneo tiene un diámetro externo menor a 4,5 mm los lavados se realizan en agitación en un recipiente cerrado, mientras que para vasos sanguíneos con diámetros externos mayores a 4,5 mm, estos tratamientos se llevan a cabo en un circuito de recirculación de fluido.

c) Recubrimiento de vaso sanguíneo con polímero hidrofílico

Una vez se ha decelularizado el vaso sanguíneo, se procede a recubrir la capa íntima o lumen del mismo con un polímero hidrofílico. Para efectos de la presente invención el polímero hidrofílico es PEG. De manera preferida, el polímero hidrofílico es PEG de cuatro brazos de alto peso molecular funcionalizado con grupos carboxilos y norboneno.

Esta etapa consta de tres fases, a saber i) sellado del vaso sanguíneo decelularizado; ii) recubrimiento del vaso de la etapa i) con polímero hidrofílico; y iii) lavado.

El sellado del vaso sanguíneo consiste en cerrar mecánicamente todas las aperturas u orificios del vaso sanguíneo decelularizado, incluyendo los extremos y bifurcaciones. Métodos conocidos en la técnica para este fin incluyen, pero no se limitan a sutura, sellado con tapones, y sellado con amarres plásticos.

Posteriormente se procede a recubrir la superficie de la capa interna del vaso sellado con una solución de polímero hidrofílico funcionalizado, que puede ser PEG con grupos carboxilo o, PEG con grupos amino . De preferencia particularmente con PEG de cuatro brazos de alto peso molecular (PEG-4AP) funcionalizado con norboneno y grupos carboxilo.

Una vez se funcionaliza el PEG, se debe preparar la solución de recubrimiento. Para efectos de la presente invención, la solución de recubrimiento comprende PEG-4AP funcionalizado en solución ácida y una sustancia entrecruzante. La sustancia entrecruzante se selecciona entre, pero no se limita a (EDC) 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) EDC y/o NHS (N-Hidrosuccinimida)

Particularmente para preparar la solución de recubrimiento, se debe preparar una solución de PE-4AP funcionalizado a una concentración entre 50 mg/mL y 30 mg/mL, preferiblemente a una concentración de 20 mg/ml, en agua acidificada a pH entre 4 y 5, preferiblemente a pH 4,5. Posteriormente, a esta solución se le adiciona entrecruzante en

proporción moles de entrecruzante:moles de terminales carboxilo en el PEG-4AP disponibles para conjugación de en un rango 5:1 a 1:1, , preferiblemente de 3:1. La mezcla anterior debe ponerse en agitación en un rango de 100 a 500 RPM durante 0,5h a 3h, preferiblemente a 300 RPM por 1h.

A continuación se deposita la solución de recubrimiento en el interior del vaso sanguíneo sellado. Para ello, se debe garantizar que el vaso esté completamente sellado y sin líquido al interior. Posteriormente, se deposita la solución de recubrimiento hasta llenar el interior del vaso sanguíneo. La deposición de la solución de recubrimiento en el vaso, puede hacerse, por ejemplo, mediante inyección. Este relleno debe permanecer en centrifugación y/o agitación entre 250 y 400 XX-XX RPM durante 5h a 24h, preferiblemente durante 7h a 300RPM a temperatura entre 18°C y 25°C.

Finalmente, se extrae la solución de recubrimiento del vaso y se realizan de 2 a 10 lavados, preferiblemente de 2 a 5 lavados con PBS o solución salina.

En este punto, es posible pasar a la etapa de conjugación con péptidos u opcionalmente, pueden almacenar los vasos en PBS a temperatura entre 0°C a 4°C hasta su funcionalización.

En una modalidad preferida, el recubrimiento se realiza con PEG-4AP funcionalizado con norboneno y grupos carboxilo a una concentración de 20 mg/mL en agua acidificada a pH 4,5y EDC en una proporción EDC: Polímero de 3:1, durante 7h en centrifugación a temperatura entre 18°C y 25°C.

d) funcionalización del recubrimiento polimérico con péptidos conjugados

Para efectos de la presente invención, los péptidos que se conjugan al recubrimiento interno del vaso son seleccionados entre péptidos de adhesión, péptidos de maduración endotelial y

mezclas de los mismos. Particularmente, los péptidos de adhesión se seleccionan entre RGD, RGDSPGRCG, GRGDSP, REDV, y los péptidos de maduración endotelial se seleccionan entre SVVYGLR, SVVYGLRGERCG, IKVAV, YIGSR, PDSGR, CAG.

Los péptidos utilizados en el método de la presente invención pueden estar disueltos en un solvente orgánico o inorgánico, y se utilizan a una concentración final entre 20 nM y 5µM. Ejemplos de solventes orgánicos incluyen agua, dimetilformamida (DMF), cloroformo, etanol, entre otros y de solventes inorgánicos incluyen agua, PBS o solución salina.

Opcionalmente, los péptidos de la invención comprenden modificaciones que incluyen pero no se limitan a acetilaciones o , amidaciones, entre otras]. En una modalidad los péptidos comprenden acetilación del extremo amino, amidación del extremo carboxilo o combinaciones de las mismas.

En la presente invención, los péptidos se utilizan en combinación con un fotoiniciador o fotoentrecruzante de tipo I. Ejemplos de fotoentrecruzantes que pueden ser incorporados a la presente invención incluyen, pero no se limitan a acilfosfinato de litio (LAP) o peróxido de benzoilo u otro que se active a longitudes de onda entre 320nm y 495 nm El fotoentrecruzante se utiliza en una concentración entre 5 mM y 25 mM, entre 5 mM y 15 mM, de preferencia 9,9 mM.

Para la funcionalización del recubrimiento polimérico con péptidos proendoteliales, se prepara una solución de conjugación que comprende los péptidos de interés a una concentración entre 20 nM y 5µM, fotoentrecruzante a una concentración entre entre 5 mM y 15 mM y cualquier tipo de solvente en coherencia con la solución madre de péptidos y de fotoentrecruzante. Esta solución se debe mantener en hielo. Asimismo, el procedimiento debe realizarse en oscuridad para no afectar la actividad del fotoentrecruzante.

Manteniendo las condiciones de oscuridad, se debe llenar completamente el vaso recubierto de polímero con la solución de conjugación preparada previamente. A continuación se

debe exponer el vaso a luz azul o luz UVA(entre 320nm y 495nm) durante 3 minutos a 60 minutos, preferiblemente durante 10 minutos.

Posteriormente, se remueven las suturas, amarres y selladuras, y se realizan lavados con PBS para remover los excesos de péptidos no unidos y fotoentrecruzante. Los injertos vasculares regenerativos elaborados por este método pueden ser almacenados en PBS a temperatura entre 0 y 4°C hasta su implantación.

Injerto vascular con matriz base de fibras poliméricas electro hiladas.

En una segunda modalidad, el injerto vascular regenerativo se produce mediante electrohilado de una mezcla de polímeros. De manera general, este método comprende a) fabricar un recubrimiento interno polimérico funcionalizado con al menos un péptido conjugado; b) preparar al menos dos mezclas de un primer polímero (P1) y un segundo polímero (P2); c) fabricar una matriz multicapa; y d) entrecruzar P1 y P2 y consolidar las interfases de las mezclas hasta obtener un injerto vascular regenerativo. Un esquema general del método se ilustra en la Figura 4.

En una modalidad preferida, el método comprende a) fabricar un recubrimiento polimérico funcionalizado con al menos un péptido conjugado; b) preparar al menos dos mezclas de un primer polímero (P1) y un segundo polímero (P2) en proporciones P1:P2 de 95:5 y 75:25, respectivamente; c) electrohilar el recubrimiento de la etapa a); d) electrohilar una primera mezcla de proporción 75:25 sobre el recubrimiento polimérico de la etapa c); e) electrohilar una segunda mezcla de proporción 95:5 sobre la primera mezcla de proporción 75:25; f) entrecruzar P1 y P2 y consolidar las interfases de las mezclas hasta obtener un injerto vascular regenerativo.

a) *fabricar un recubrimiento polimérico funcionalizado con al menos un péptido conjugado*

La fabricación del recubrimiento polimérico funcionalizado con al menos un péptido comprende cuatro fases, a saber i) diluir un polímero biodegradable carboxilado en solvente; ii) activar los grupos carboxilo; iii) funcionalizar el polímero con terminales amina y péptidos; y iv) electrohilar la matriz.

Para efectos de la presente invención, el polímero biodegradable carboxilado es seleccionado entre PEUU, PCL, PHA o mezclas de los mismos. En una modalidad preferida, es PEUU.

El primer paso en la fabricación del recubrimiento, es diluir el polímero biodegradable carboxilado en un solvente orgánico hasta una concentración de 5% a 10% p/v, de preferencia de 6% p/v. Ejemplos de solventes orgánicos incluyen, pero no se limitan a cloroformo, ácido acético, acetona o DMF, o mezclas de ellos. La dilución se mantiene en agitación a una velocidad entre 200 y 800 RPM, preferiblemente a 500 RPM y temperatura entre 40°C y 60°C, particularmente a 55°C, durante 3 a 6h, preferiblemente durante 4h.

A continuación, a la dilución de polímero preparada anteriormente, se añade una o más sustancias entrecruzantes, y un potencializador para el entrecruzamiento. Para efectos de la presente invención, la sustancia entrecruzante es un entrecruzante para enlace peptídico como EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) y el potencializador para el entrecruzamiento es NHS N-hidrosuccinimida. Particularmente, el entrecruzante y el potencializador se adicionan respecto al número de moléculas de carboxilo en la dilución de polipéptido carboxilado en una proporción carboxilo:entrecruzante o carboxilo:potencializador de 1:2 a 1:10, preferiblemente de 1:5. La mezcla se mantiene en agitación de 200 a 800 RPM, preferiblemente a 500 RPM, a 40°C y 60°C, particularmente a 55°C, durante 10 a 30 minutos, preferiblemente durante 15 minutos. Este paso, permite la activación de los carboxilos para su posterior funcionalización con un polímero hidrofílico y péptidos proendoteliales.

La funcionalización se lleva a cabo añadiendo a la mezcla un polímero hidrofílico funcionalizado con terminales amina y a continuación péptidos proendoteliales de interés. Particularmente, el polímero hidrofílico es PEG de 4 brazos de alto peso molecular (PE-4AP) funcionalizado con grupos amino (PEGamino) y/o norboneno, y los péptidos proendoteliales son péptidos de adhesión y/o de maduración endotelial como se han descrito a lo largo de este documento.

El PEG-4AP funcionalizado se añade a la mezcla en una proporción carboxilo:PEGamino entre 1:1 y 1:5, preferiblemente de 1:2 y se mantiene la mezcla en agitación entre 200 y 800 RPM, preferiblemente a 500 RPM y temperatura entre 40°C y 55°C, particularmente a 55°C, durante 3 a 10h, preferiblemente durante 4h. A continuación, se añaden a la mezcla los péptidos de interés, cada uno en una proporción carboxilo:péptido entre 1:2 y 1:10, preferiblemente de 1:5 y se mantiene agitación entre 200 y 800 RPM, preferiblemente a 500 RPM y temperatura entre 40°C y 60°C, particularmente a 55°C, durante 18 a 36h, preferiblemente durante 24h. En una modalidad, se añaden a la mezcla al menos un péptido de adhesión y al menos un péptido de maduración endotelial.

La mezcla obtenida del paso anterior, se denomina solución funcionalizada con enlaces covalentes poliuretano-PEG-Péptidos. En esta solución, se deja evaporar el solvente orgánico y se somete a un proceso de electrohilado, para obtener el recubrimiento interno polimérico funcionalizado con péptidos, que finalmente se lava con agua destilada.

En la presente invención, el electrohilado se lleva a cabo durante 1h bajo los siguientes parámetros (Tabla 1):

Tabla 1. Parámetros de electrohilado del recubrimiento polimérico interno

Parámetro	Medida
Voltaje	5 a 8 kV, de preferencia 7kV
Tasa de inyección	0,5mL/h a 1,8mL/h, de

	preferencia 1,5 ml/h
Distancia aguja-colector:	11 cm a 12 cm (de preferencia 10 c)
velocidad del rotor	De 800RPM a 1500RPM (de preferencia 1000RPM)
tiempo	De 45min a 75 min (de preferencia 60min)

El electrohilado del recubrimiento interno se realiza sobre un mandril de acero inoxidable cuyo diámetro varía entre 2 mm y 25mm, en donde el desplazamiento oscilatorio de la aguja es de 15 cm a una velocidad de 1cm por segundo. Una vez obtenido el recubrimiento interno, este se lava con agua destilada.

b) Preparación de mezclas de un primer polímero (P1) y un segundo polímero (P2)

En la presente invención, el primer polímero de la mezcla (P1), es un polímero biodegradable que se selecciona del grupo que comprende PEUU, PCL y PHA. El segundo polímero es colágeno. En una modalidad, el segundo polímero es colágeno hidrolizado (CH). En una modalidad particular, el colágeno hidrolizado es gelatina tipo A.

En esta etapa, se preparan soluciones madre de P1 y P2, en donde cada solución madre es una solución de P1 o P2 en un solvente orgánico a una concentración entre 5% y 20%. El solvente orgánico es seleccionado entre ácido acético glacial, cloroformo, DMF o acetona o mezclas de ellos, a una concentración entre 5% y 20%, preferiblemente se preparan las soluciones en ácido acético glacial al 80% con una concentración de 10% peso volumen del polímero.

La preparación de las soluciones madre se lleva a cabo en condiciones de agitación a 200-800 RPM, preferiblemente a 500 RPM, temperatura entre 40°C y 60°C, particularmente a 55°C, durante 3-10h, preferiblemente durante 4h.

A continuación, se preparan diferentes mezclas de P1:P2 en diferentes proporciones, en el mismo solvente orgánico utilizado en las soluciones madre, en donde cada mezcla tiene una concentración final de mezcla de polímero entre 8% y 20%, particularmente de 12,5% p/v.

Las mezclas se preparan por la metodología gota a gota, que consiste en tomar la cantidad requerida de la solución de P2 y colocarla en agitación a 600-1200 RPM, preferiblemente a 900 RPM, a temperatura entre 40°C - 60°C, particularmente a 55°C, y depositar sobre esta solución de P2, la cantidad requerida de P1 mediante goteo permitiendo que se forme una mezcla homogénea. La mezcla se deja en agitación constante a 900 rpm durante 4 horas hasta generar una emulsión con la porción acuosa.

Para efectos de la presente invención, se preparan tantas mezclas como sea necesario, en donde cada mezcla corresponde a una proporción específica de cada polímero, y en donde cada mezcla es la base para fabricar una capa del injerto.

Las mezclas se preparan en proporciones P1:P2 entre 100:0 y 60:40, por ejemplo de 95:05, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, entre otros. En una modalidad, se preparan dos mezclas, pues el injerto vascular regenerativo multicapa comprende dos capas. En otra modalidad, se preparan tres capas, pues el injerto vascular regenerativo multicapa comprende tres capas.

En una modalidad preferida, se preparan tres mezclas: una primer mezcla en proporción P1:P2 de 75:25, una segunda mezcla en proporción P1:P2 de 85:15 y una tercer mezcla en proporción P1:P2 de 95:05, en donde la concentración total de polímero en cada mezcla es de 12,05%.

En una modalidad preferida, P1 es PEUU, P2 es gelatina tipo A y el solvente es ácido acético glacial al 80% p/v.

c) fabricar una matriz multicapa

A partir de las mezclas elaboradas en el paso anterior, se elabora la estructura multicapa porosa tubular del injerto vascular de la invención. Cada capa se elabora mediante electrohilado, de manera sucesiva, una capa sobre la otra. Primero, se deposita la capa con mayor concentración de P2, y se finaliza con la de menor contenido de P2. El resultado final es una estructura con diámetro interno entre 2 y 25 mm

Los parámetros de electrohilado de cada capa se muestran en la Tabla 2. La capa 1 es la capa con mayor concentración de P2 (la más interna) y la capa 3 es la capa con menor concentración de P2 (la más externa).

Tabla 2. Parámetros de electrohilado de las capas de la estructura multicapa porosa del injerto vascular

Parámetro	Capa 1	Capa 2	Capa 3
Voltaje	(4kv a 6kv) de preferencia 5 kV	(5kv a 8kv) de preferencia 6 kV	(6kv a 9kv) de preferencia 7 kV
Tasa inyección	(0,5mL/h a 1,5mL/h) de preferencia 1,5mL/h	(1,5mL/h a 3mL/h) de preferencia 2 mL/h	(2mL/h a 3,5mL/h) de preferencia 3mL/h
Distancia aguja-colector	(10cm a 12 cm) de preferencia 11	(10cm a 12 cm) de preferencia 11	(10cm a 12 cm) de preferencia 11

	cm	cm	cm
Velocidad del rotor	(200RPM a 300RPM) de preferencia 250 RPM	(200RPM a 300RPM) de preferencia 250 RPM	(200RPM a 300RPM) de preferencia 250 RPM
Tiempo	(45min a 75 min, de preferencia 60 min	(45min a 75 min, de preferencia 60 min	(45min a 75 min, de preferencia 60 min

d) entrecruzamiento de P1 y P2 y consolidación de las interfases de las mezclas hasta obtener un injerto vascular regenerativo

Una vez se obtiene la estructura multicapa electrohilada sobre el mandril, se somete a un proceso de entrecruzamiento con un segundo entrecruzante para preservar la integridad de la estructura. El segundo entrecruzante se selecciona de los posibles entrecruzantes capaces de generar enlaces amino-amino entre proteínas, se selecciona preferiblemente el glutaraldehído.

Para ello, se sumerge la estructura multicapa electrohilada aún dispuesta sobre el mandril en una solución del segundo entrecruzante a una concentración entre 10-25%, preferiblemente al 25% v/v, en agitación a baja velocidad, por ejemplo entre 10 y 50 RP, preferiblemente 10 RPM urante 12 a 24h, preferiblemente durante 24h.

A continuación, se deben eliminar las secciones muy delgadas de los extremos del injerto (entre 1 y 2 cm de los bordes) y desmontar el injerto del mandril colocándolo bajo un chorro de agua tipo II y haciendo presión uniforme hacia abajo sin doblar el injerto.

Una vez el injerto ha sido desmontado, es necesario remover los residuos de entrecruzante y otras sustancias usadas en el proceso de fabricación. Para ello, se utilizan soluciones que

laven efectivamente el entrecruzante o abundante agua Ejemplos de soluciones que pueden usarse en esta etapa incluyen, pero no se limitan a ácido glutámico.

Para efectos de la presente invención, se sumerge el injerto vascular en una solución de ácido glutámico a concentración entre 3% y 10%, preferiblemente al 5% p/v, en una relación gramos de injerto:mL de ácido glutámico al 5% de 1 g:50 mL durante 24 horas en agitación a 20 RPM y 100 ROM, particularmente a 50 RPM.

Posteriormente, se realiza un proceso de diálisis con agua tipo I, que consiste en sumergir el injerto vascular en agua tipo I en una relación gramos de injerto:mL de agua tipo I de 1 g:500 mL, cambiando el agua cada 12h. Este proceso se realiza durante 24 a 48h h.

Opcionalmente, el injerto vascular obtenido se seca a temperatura entre 18°C y 25°C en cabina de flujo durante 24h y se esteriliza. Los métodos de esterilización incluyen, pero no se limitan a tratamiento con óxido de etileno o tratamiento con etanol.

El injerto vascular regenerativo de la invención se puede almacenar a temperatura ambiente entre 18°C y 25°C en condiciones de esterilidad.

Aplicaciones de los injertos vasculares regenerativos

Los injertos vasculares regenerativos de la presente invención pueden utilizarse como reemplazos y conexiones entre vasos sanguíneos integrados al tejido nativo dando continuidad al flujo sanguíneo de manera que imita las condiciones fisiológicas. Esto se logra a partir de la regeneración de la pared vascular sobre un substrato que responde de manera controlada a la respuesta inflamatoria y opera de manera óptima bajo condiciones hemodinámicamente complejas mientras estimula la formación de un endotelio funcional y la repoblación de dicha matriz.

Particularmente, los injertos vasculares de la invención superan diversas dificultades técnicas que comúnmente se presentan tras las implantaciones de injertos vasculares, como se presenta en la Tabla 3 y en la Figura 5.

Tabla 3. Dificultades relacionadas con la intervención de implante de injertos vasculares superados por la invención.

Fase	Dificultades técnicas	Componente de la invención que supera la dificultad técnica
I: Cirugía y post-operatorio	Filtrado de sangre (dificultad para lograr hemostasia); Ruptura del injerto por sutura; Colapso del vaso/injerto Trombo instantáneo dentro del vaso.	Baja porosidad de la capa interna; Material suturable (resistencia a la cizalla); Capacidad de retener heparina en el momento de la implantación; Estructura de colágeno en una distribución y geometría que garantiza dobleces suaves.
II: Interacción con sangre	Activación plaquetaria; Formación de trombos en superficie; Alteración al flujo por ausencia de continuidad mecánica.	Tratamiento superficial hidrofílico; Prevención de agregación plaquetaria; Biomímesis mecánica para garantizar correcta perfusión bajo flujo pulsátil.
III: Estabilizar la respuesta inflamatoria	Estabilización del trombo fibrótico; Microambiente de inflamación	Señales biomiméticas; Péptidos proendoteliales; Colágeno presente a lo largo de

	crónica.	la matriz para simular ECM; Hemodinámica fisiológica.
IV: Reendotelializar	Parches de células aislados; Desprendimiento de células adheridas; Endotelio no madura a fenotipo funcional; Ausencia de endotelio.	Topografía que guía el flujo para favorecer la deposición de células proendoteliales; Péptidos proendoteliales para adhesión y maduración; Mecanotransducción optimizada por biomímesis para maduración.
V: Remodelar la pared vascular	Desbalance en la proporción de las poblaciones celulares en el injerto (hiperproliferación); Inestabilidad de la matriz extracelular (calcificación).	Porosidad externa para migración de células musculares a la matriz; Matriz a base de colágeno ideal para promover el remodelamiento del tejido; Multicapa optimizada para las diferentes poblaciones celulares.

Además, los injertos vasculares regenerativos de la invención poseen numerosas ventajas sobre otros injertos del arte previo, que incluyen, su producción a partir de sustratos escalables y con materiales altamente disponibles, funcionalización selectiva que evita activación plaquetaria pero promueve la adhesión celular, porosidad y comunicación con tejido perivascular que favorece la formación de la pared, propiedades mecánicas análogas al tejido que evitan discontinuidad en el flujo y su fácil manipulación, que les dota de un potencial uso clínico en cirugía. Además el injerto vascular es punzonable múltiples veces sin activar respuesta inflamatoria crónica, manteniendo la hermeticidad gracias a las fibras de colágeno presentes en la matriz, lo que es de gran utilidad en aplicaciones como fistulas arteriovenosas o accesos vasculares.

Por lo anterior, los injertos vasculares regenerativos desarrollados en la presente invención proporcionan diversos beneficios para la reparación o regeneración de tejido vascular, incluyendo reparación o regeneración de tejido ante cualquier pérdida ocurrida por razones como trastornos genéticos, trauma, enfermedades vasculares agudas y crónicas, e incluso intervenciones quirúrgicas, así como trasplantes y la creación de accesos vasculares en general. Particularmente, los injertos vasculares regenerativos de la invención tienen aplicaciones en el tratamiento de individuos que padecen una condición, enfermedad o lesión cardiovascular en condiciones como la enfermedad vascular periférica, enfermedad coronaria, cardiopatía congénita, aneurismas, o que requieren accesos vasculares, hemodiálisis o cualquier otra que requiera el reemplazo de uno o más vasos sanguíneos, incluyendo trauma y trasplante.

La presente invención será presentada en detalle a través de los siguientes ejemplos, los cuales son suministrados solamente con propósitos ilustrativos y no con el objetivo de limitar su alcance.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Elaboración de los injertos vasculares regenerativos

Ejemplo 1A. Elaboración de los injertos vasculares regenerativos basados en vasos sanguíneos de mamífero

Preparación de los vasos sanguíneos

Para la fabricación de los injertos vasculares de la invención, se adquirieron corazones porcinos en un proveedor local, los cuales fueron embalados y transportados en condiciones óptimas hasta el laboratorio de procesamiento.

Los corazones fueron lavados con agua corriente para remover sangre, coágulos y otras impurezas. Posteriormente, se identificaron y extrajeron las arterias coronarias. Se obtuvieron dos segmentos de arteria coronaria. Se diseccionaron las arterias y se limpiaron, retirando tejido conectivo y tejido graso alrededor del vaso.

A continuación, se lavaron los segmentos de arteria en agua tipo II, en agitación orbital 200RPM, haciendo cambios de agua cada 10 minutos hasta que el agua resultante quedó transparente.

Los pasos posteriores se realizaron en cabina de flujo laminar. Se trabajó únicamente con reactivos y sustancias estériles.

Decelularización

Se sumergieron las porciones de arteria carótida en PBS en un tubo de centrifuga de 50mL y se llevó a ultrasonificación a 20°C durante 15 minutos. En paralelo, se prepararon 500 mL de SDS al 1%, que contenía 5g de SDS en polvo en 500 mL de agua tipo I estéril. También se prepararon 100 mL de solución de Tritón 100X al 1% disolviendo 1 mL de Triton y en 99 mL de agua tipo I estéril.

Una vez terminó la ultrasonificación, se descartó el PBS del tubo que contenía las porciones de arteria carótida y se llenó con SDS al 1%, se agregó DNAsa (1U) y se llevó a agitación a 200 RPM durante 4h.

En total se realizaron tres ciclos de tratamientos físicos y químicos de decelularización como se describe a continuación:

Ciclo	Sub-etapa	Tratamiento	Condiciones	Tiempo
1	1	Ultrasonificación	Con PBS, T= 20°C	15 minutos

	2	Lavado con SDS 1% y DNAsa 1U	Agitación a 200 RPM	4 horas
	3	Lavado con agua tipo I	agitación a 200 RPM	30 minutos
2	1	Ultrasonificación	con PBS, T=20°C	15 minutos
	2	Lavado con SDS al 1%	agitación a 200 RPM	2 horas
	3	Lavado con agua tipo I	agitación a XX RPM	30 minutos
3	1	Ultrasonificación	con PBS T=20°C	15 minutos
	2	LAVADO CON Tritón 100X	Agitación a XX RPM	30 minutos

A continuación, se realizaron tres lavados adicionales con agua tipo I, cada uno de 15 minutos en agitación a 200 RPM. Finalmente, el tubo se llenó con PBS y se mantuvo a 4°C durante 12h, hasta el día siguiente en donde se hizo el recubrimiento del lumen. Las arterias resultantes de este proceso están decelularizadas.

Recubrimiento con polímero hidrofílico

Posteriormente se prepararon 3 mL de PEG funcionalizado con norboneno y grupos carboxilo (PEG-COOH-NB) a una concentración de 20 mg/mL. Particularmente se diluyeron 60 mg de PEG-COOH-NB y 6,74 mg de EDC en agua estéril acidificada a pH 4,5 con HCL 1M. Se llevó a agitación a 400 RPM RPM durante 1h a XX°C.

Pasadas 12h de refrigeración, se sumergieron las arterias decelularizadas en agua tipo I estéril y se suturaron sus extremos y bifurcaciones. Para verificar que hayan quedado completamente selladas, se inyectó PBS estéril y se revisó que no hubiera pérdida de líquido. A continuación se succionó el PBS y se inyectó la arteria con la solución de PEG-

COOH-NB y EDC. Se llevó a agitación a 300 RPM durante 7h. A continuación, se removió la solución de PEG-COOH-NB y EDC y se lavó con PBS utilizando una jeringa.

Funcionalización con péptidos proendoteliales

Se prepararon dos soluciones de péptidos los péptidos RGDSPGRCG (péptido RGD) y SVVYGLRGERCG (péptido SKVVLR) en PBS. Se prepararon 500 mL de cada solución a una concentración de 50 μ M (RGD) y 15 μ M (SKVVLR).

A partir de estas soluciones, se preparó 1 mL de la mezcla de funcionalización. Particularmente se añadieron 20 mL de la solución de RGD, 67mL de la solución de SVVGLR, y 715 mL de PBS estéril. A continuación y en condiciones de oscuridad, se añadió añadieron a la mezcla 198 mL de LAP 50 mM (fotoentrecruzante).

Esta solución se inyectó en las arterias coronarias decelularizadas selladas y se expusieron a luz azul, con longitud de onda de 405 nm durante 10 minutos. La arteria se expuso por todos sus lados.

Una vez terminado este proceso, se soltaron las suturas y se realizaron varios lavados con PBS. Los injertos vasculares regenerativos producidos se almacenaron en PBS a 4°C hasta su uso. Las Figuras 6A a 6C ilustran la estructura e histología del injerto vascular regenerativo generado.

Ejemplo 1B. Elaboración de los injertos vasculares regenerativos basados en fibras poliméricas electrohiladas

Funcionalización de polímero Carboxilado con PEG y péptidos.

Los polímeros PEUU y PEUU-COOH (carboxilado) fueron fabricados por el Laboratorio de Ingeniería Cardiovascular del Instituto de Medicina Regenerativa McGowan de la

Universidad de Pittsburgh. Para la funcionalización de PEUU con PEG y péptidos, se pesaron 250 mg de PEUU-COOH y se disolvieron en 5 ml de cloroformo bajo agitación magnética a 300 rpm durante 1 hora. Posteriormente se agregaron 50 mg de EDC y 30 mg de NHS y se calentó a 50°C durante 20 minutos.

Posteriormente se agregaron 9 mg de PEG de 4 brazos y 20 kDa con terminaciones NH₂. La mezcla se dejó en agitación a 500RPM durante 6 horas. Finalmente se agregó 1 µl de solución de péptido, RGD 50 mM y 1 µl de solución de péptido SVVYGLR 15 mM. Cada solución de péptido usó como solvente DMF. La mezcla se dejó reaccionando durante 12 horas y se reservó para el proceso de electrohilado.

Preparación de mezclas de un primer polímero (P1) y un segundo polímero (P2)

Se preparó una solución madre de PEUU (P1) que contenía 3,75g de PEUU disueltos en 30 ml de ácido acético glacial en agitación magnética a 300 rpm durante 2 horas. Paralelamente se preparó una solución madre de gelatina tipo A (P2), que contenía 1,25g de gelatina tipo A disueltos en 10 ml de ácido acético glacial en agitación magnética a 500 rpm durante 2 horas.

Las mezclas de PEUU y gelatina se obtuvieron mediante una técnica de desolvatación. Para ello, se cargó la solución de PEUU en una jeringa de 10 ml con una aguja 21 G. Para obtener las soluciones de PEUU:gelatina en proporciones 75:25, 85:15 y 95:05, en 3 frascos diferentes, se depositaron 3 ml, 1,5 ml y 0,5 ml de solución de gelatina tipo A respectivamente. Todas las soluciones se llevaron a 10 ml aplicando la solución de PEUU gota a gota en agitación magnética a 1000 rpm para permitir la correcta dispersión de los monómeros del PEUU. Cada una de las soluciones finales de PEUU:Gelatina tenían una concentración final de polímero total de 12,5% p/v. Las 3 soluciones se reservaron para el proceso de electrohilado.

Fabricación de la matriz multicapa

Se realizó el montaje del equipo de electrohilado utilizando un mandril de acero inoxidable de 4 mm de diámetro y 20 cm de longitud que se conectó al polo negativo. El PEUU-COOH funcionalizado con PEG y péptidos, fue cargado en una jeringa de 10 ml y se conectó a una manguera de teflón de 1,6 mm de diámetro interno con una aguja 16 G. El conjunto se montó en una bomba de infusión y la aguja 16 G se posicionó en el polo positivo a una distancia de 11 cm del mandril. La manguera se purgó hasta la salida de la primera gota del polímero y se encendió el equipo de electrohilado.

El mandril se sometió a rotación a 1000 rpm, la tasa de inyección se ajustó a 1ml/h y el voltaje a 7 kV. Se permitió la deposición de las fibras generadas durante 1 hora.

Posteriormente, se cargó la solución de polímeros P1:P2 en proporción 75:25 en una jeringa de 10 ml y se montó en la bomba de infusión. Se purgó la manguera para retirar el polímero anterior. La configuración del equipo para esta capa incluyó una rotación del mandril 250 rpm, con una tasa de inyección de 1,5 ml/h y se ajustó el voltaje a 5 kV, se permitió la deposición de las fibras por 1 hora. El procedimiento se repitió con las soluciones de polímero 85:25 y 95:5 modificando la tasa de inyección a 2 ml/h y 3 ml/h, respectivamente, y ajustando el voltaje a 6 kV y 7 kV, respectivamente. El tiempo total de electrohilado fue de 4 horas para la deposición de 4 ml, que generaron un injerto con una pared de aproximadamente 1 mm de grosor y 15 cm de longitud.

Una vez finalizado el proceso de electrohilado, el mandril de acero inoxidable con el injerto se retiró cuidadosamente del equipo y se colocó bajo la cabina de extracción durante 2 horas para retirar cualquier remanente de solvente.

Entrecruzamiento de P1 y P2 y consolidación de las interfases de las mezclas hasta obtener un injerto vascular regenerativo

Posteriormente, para realizar el entrecruzamiento de la gelatina, el mandril con el injerto se colocó dentro de un contenedor tubular, se sumergió completamente en glutaraldehído al 25% y se dejó sobre una plataforma de agitación a 10 rpm durante 12 horas.

Una vez finalizado el tiempo de entrecruzamiento, el mandril con el injerto se retiró del glutaraldehído, y se colocó bajo un chorro de agua tipo II para remover el injerto del mandril.

Para remover cualquier remanente de glutaraldehído, se preparó una solución de ácido glutámico que contenía 5 gramos de ácido glutámico disueltos en 100 ml de agua tipo II. A esta solución se le adicionaron 1,8 ml de ácido clorhídrico (HCL) puro. A esta solución se le denominó solución de limpieza.

El injerto entrecruzado se sumergió en 30 ml de la solución de limpieza y se llevó a agitación a 50 RPM durante 1 hora. Posteriormente el injerto entrecruzado se lavó con un chorro de agua tipo II durante 1 minuto. El procedimiento se repitió tres veces.

Finalmente, el injerto vascular lavado se sometió a un proceso de liofilización durante 24 horas para retirar cualquier otro remanente del procesamiento, y posteriormente se esterilizó en óxido de etileno.

Las Figuras 7A a 7D muestran la estructura del injerto vascular obtenido, una microfotografía SEM e histología de un corte trasversal del mismo.

Ejemplo 2. Caracterización biomecánica

Con el propósito de garantizar la capacidad del injerto vascular de soportar las condiciones fluidodinámicas en el sitio de implantación los injertos se someten a ensayos de resistencia mecánica biaxial.

En estos ensayos una probeta del injerto vascular se acopla en un sistema que mide la fuerza requerida para generar una deformación a una tasa fija y así medir la elasticidad de la probeta. Esta prueba se realizó en los injertos vasculares diseñados y en las arterias nativas, encontrando los resultados en la figura 1. Estos resultados evidencian que en dirección circunferencial, los injertos a base de vasos decelularizados y a base de fibras poliméricas electrohiladas mantienen elasticidad comparable con la arteria nativa para las deformaciones que ocurren en el espectro fisiológico. Las Figuras 8A a 8C muestran los resultados de las pruebas de esfuerzo circunferencial del injerto vascular regenerativo basado en vaso decelularizado. En estas se evidencia que el proceso de decelularización no afecta las propiedades mecánicas del vaso puesto que los rangos de carga para las figuras 8A y 8B se sobreponen. Por otro lado se evidencia que el entrecruzamiento representa un refuerzo estructural al injerto.

Las Figuras 9A a 9C muestran los resultados de las pruebas de esfuerzo circunferencial después de punzonamiento del injerto vascular regenerativo basado en vaso decelularizado; comparado con las gráficas en las figuras 8A a 8C, se demuestra que el punzonamiento no genera alteración estructural manteniendo los rangos de operación mecánica del injerto previo punzonamiento. Las Figuras 10A y 10B muestran los resultados de las pruebas de esfuerzo circunferencial del injerto vascular regenerativo basado en polímeros electrohilados en las que se demuestra que a pesar de que cada capa de manera independiente tiene propiedades elásticas diferentes al vaso nativo (10A), una vez se genera el injerto multicapa, los rangos de operación de dicho injerto son comparables con la arteria nativa (10B).

Ejemplo 3. Caracterización microscópica

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se utilizó microscopía electrónica de barrido (SEM) para observar la morfología de la superficie interior y exterior de los injertos. Las Figuras 11A y 11B muestran las

microscopías (SEM) de la superficie de la arteria decelularizada, la superficie del injerto basado en vaso sanguíneo funcionalizado con recubrimiento PEG y péptidos. La Figura 11C muestra la cara externa y lumen interno de un injerto a base de polímeros electrohilados. Para obtener estas imágenes los injertos fueron llevados a punto crítico de deshidratación y recubiertos con oro. En estas figuras se observa como con el recubrimiento con polímeros y péptidos se cubre la estructura colagenosa de la arteria nativa (11B y 11A) y cómo para el injerto multicapa electrohilada, la porosidad resultante del entrecruzamiento de fibras es gradualmente creciente desde la íntima hacia el exterior del injerto (11C)

Verificación estructural de los injertos por histología

Con respecto a los injertos vasculares basados en arterias porcinas, posterior al proceso de decelularización de las arterias porcinas se realizó una verificación de la cantidad de células remanentes en la matriz extracelular que será utilizada como injerto vascular regenerativo. Dicha verificación se desarrolló posterior a la tinción de cortes histológicos de las muestras con hematoxilina/eosina por medio de un conteo de células que pueden evidenciarse en tonalidades púrpura dentro de la matriz teñida de rosa (Figura 12A). Además de esto, esta figura demuestra que el proceso de decelularización no afecta la estructura concéntrica característica de la arteria nativa.

Con respecto a los injertos vasculares basados en polímero y gelatina, se realizó una tinción tricrómica de Masson para confirmar la presencia de colágeno en la estructura del injerto. Es posible observar en la imagen, cómo las distintas capas del injerto poseen una concentración específica de gelatina (Figura 12B)

Caracterización de la porosidad: diámetro del poro

Se caracterizó el tamaño de poro de cada capa en los injertos vasculares basados en vasos sanguíneos como de los injertos basados en electrohilado de polímeros. Los resultados de dicha caracterización se ilustran en las Figuras 13A y 13B. Particularmente, en ambos tipos de injertos se observa el gradiente de porosidad, en donde el tamaño de poro es menor en

las capas más internas y aumenta hacia las capas externas. Esta caracterización se hizo a partir del análisis de imagen de las histologías hechas a cada uno de los injertos utilizando el software Image J y los filtros de medición de área.

Ejemplo 4. Pruebas de hemocompatibilidad

Hemólisis

Después de tomar una muestra de sangre humana de un voluntario, se separaron los eritrocitos a partir de procesos de centrifugación y lavado. Estos eritrocitos extraídos de sangre humana de un sujeto sano fueron expuestos a muestras de injertos durante 1 hora e incubados a 37°C en una placa de cultivo de 96 pozos. La placa conteniendo la solución de eritrocitos y los injertos, e fue centrifugadas para separar los eritrocitos completos del líquido compuesto por agua y células rotas. El sobrenadante fue retirado y se midió la absorbancia de las muestras para establecer la cantidad de hemoglobina liberada por los eritrocitos lisados debido al contacto con el injerto.

Como control positivo se utilizó tritón y como control negativo solución salina. Para todos los casos se obtuvieron porcentajes de hemólisis por debajo de 5% como se muestra en la Figura 14. Esto indica que ninguna de las variaciones del injerto genera lisis de las células sanguíneas, verificando que no el contacto con el material que lo compone no es tóxico para la sangre.

Actividad plaquetaria

Para evaluar la actividad plaquetaria al contacto con el injerto, se puso el injerto en contacto con una suspensión de plaquetas y posteriormente, se evaluó su actividad a través de la medición del número de plaquetas adheridas a la superficie.

Se obtuvo plasma rico en plaquetas (PRP) a partir de muestras de sangre de individuos sanos. A continuación este PRP se puso en contacto con los injertos basados en vasos sanguíneos funcionalizados (DF), arterias decelularizadas (D), PEUU:Gelatina (P) y PEUU:Gelatina Funcionalizado (PF)) y un control positivo de que consiste en un injerto convencional de PTFE bañado en epinefrina (PTFE Eph). El contacto se mantuvo durante 1h y se realizó un lavado de las muestras con PBS para retirar las plaquetas en suspensión no adheridas.

Las plaquetas adheridas se lisaron usando Triton 100X y se midió su actividad metabólica a través de LDH.

Como se ilustra en la Figura 15, el injerto vascular de vaso funcionalizado (DF) redujo la cantidad de plaquetas adheridas con respecto a la arteria decelularizada (D). Asimismo, los injertos multicapa (P) y multicapa funcionalizados (PF) muestran un porcentaje bajo de agregación plaquetaria.

Ejemplo 5. Pruebas de citocompatibilidad

El éxito del injerto vascular regenerativo depende de su potencial para sostener la reendotelialización, es decir la adhesión y proliferación de células proendoteliales en el lumen del vaso. Para esto se ejecutaron pruebas de adhesión, proliferación y actividad de células progenitoras endoteliales HUVECs sobre los injertos vasculares.

Prueba de citotoxicidad directa

En la prueba de citotoxicidad directa se siembra un número conocido de células sobre la superficie de los materiales a estudiar y evaluar su condición final después de haber estado 254h expuestas al contacto con el material. Según los resultados de la Figura 16A, la arteria funcionalizada con el polímero y los péptidos seleccionados (CA+PEG+D) La mezcla D, corresponde a la mezcla de polímeros RGD y SKVVLGR. Esta demostró sostener con

mayor efectividad el número de células vitales en la superficie. Por su parte el injerto de PEUU:Gel (MC) mostró mantener la viabilidad estable similar al polímero solo y a los controles comerciales de PET y PTFE (Figura 16B)

Maduración de células proendoteliales

Pasados 15 días de cultivo celular sobre las arterias decelularizadas y funcionalizadas, se realizó extracción de ARN. Posteriormente, se comprobó la integridad del ARN y se realizó la amplificación de genes relativos a la actividad de células endoteliales con relación a un gen constituyente como referencia de la cantidad de material genético presente en la muestra por medio de PCR en tiempo real.

En todos los casos, las arterias tratadas con péptidos evidenciaron presencia de los genes estudiados con resultados cercanos a los del control (arteria sin funcionalizar). Sin embargo, en el caso de CD44 y NOS3, se obtuvieron resultados superiores comparados con el control (Figura 17).

Ejemplo 6. Evaluación in vivo de los injertos vasculares

Para evaluar la viabilidad clínica del injerto se ejecutó un estudio piloto en el que 8 sujetos fueron implantados con injertos vasculares regenerativos. A cada uno de estos modelos animales (conejos) les fue implantado un injerto vascular regenerativo en la aorta abdominal, por debajo de las derivaciones renales. Estas cirugías fueron ejecutadas por cirujanos cardiovasculares de la Fundación Cardioinfantil, en las instalaciones del bioterio de la Universidad Javeriana, bajo aprobación de su comité de ética de uso de modelos animales y en condiciones asépticas, bajo anestesia y garantía de confort equivalente a las condiciones quirúrgicas para humanos. Una vez aislada la arteria abdominal del conejo una porción fue reseccionada y reemplazada mediante la implantación del injerto vascular a través de anastomosis termino terminal. El injerto demostró ser implantable y mantenerse permeable durante los tiempos perioperatorios. Al final de la cirugía y habiendo

demostrado supervivencia a la misma saliendo exitosamente de anestesia, los conejos fueron llevados a eutanasia para la evaluación del injerto. Se observó que el injerto se mantenía permeable y no mostraba señales de daños por contacto con el ambiente biológico. Las fotografías 18A a la C muestran el caso de un sujeto que fue intervenido y describen las etapas de alistamiento preoperatorio (A), el injerto anastomosado al lugar del implante (B) y post necropsia (C).

Se debe entender que la presente invención no está limitada a las modalidades descritas e ilustradas, pues como será evidente para una persona versada en el arte, existen variaciones y modificaciones posibles que no se apartan del espíritu de la invención, definido por las siguientes reivindicaciones.