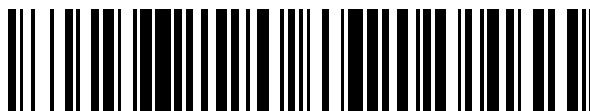


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 756 332**

51 Int. Cl.:

<b>A61L 27/36</b>	(2006.01)
<b>A61L 27/52</b>	(2006.01)
<b>A61L 27/48</b>	(2006.01)
<b>A61L 27/34</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/74</b>	(2006.01)
<b>A61L 26/00</b>	(2006.01)
<b>A61L 15/40</b>	(2006.01)
<b>A61K 35/50</b>	(2015.01)
<b>C12N 5/00</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.09.2013 PCT/US2013/058940**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **13.03.2014 WO14040026**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2013 E 13834448 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019 EP 2897625**

54 Título: **Membrana amniótica y su uso en cicatrización de heridas y construcciones de ingeniería tisular**

30 Prioridad:

**10.09.2012 US 201261698960 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.04.2020**

73 Titular/es:

**WAKE FOREST UNIVERSITY HEALTH SCIENCES  
(100.0%)  
Medical Center Boulevard  
Winston-Salem, NC 27157, US**

72 Inventor/es:

**SKARDAL, ALEKSANDER;  
ATALA, ANTHONY y  
MURPHY, SEAN, V.**

74 Agente/Representante:

**MILTENYI , Peter**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o  
Bemerkungen) en el folleto original publicado por  
la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 756 332 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**

Membrana amniótica y su uso en cicatrización de heridas y construcciones de ingeniería tisular

**5 Campo de la invención**

Membrana amniótica y su uso en cicatrización de heridas y construcciones de ingeniería tisular.

**Antecedentes de la invención**

10 Las quemaduras extensas y las heridas cutáneas de espesor completo pueden ser devastadoras para los pacientes, incluso cuando se tratan. Se estima que hay 500.000 quemados tratados en los Estados Unidos cada año (Cherry et al., 2008, Natl Health Stat Report: 1-39; Pitts et al, 2008, Natl Health Stat Report: 1-38). La tasa de mortalidad total por lesiones por quemaduras fue del 4,9 % entre 1998-2007 y los costes médicos del tratamiento de quemados se aproxima a los 200.000 millones de dólares por año (Miller et al., 2008, J Burn Car Res, 29: 862-871). Globalmente, esta estadística aumenta a 11 millones de lesiones por año (Peck, 2011, Burns, 37: 1087-1100). Además de las quemaduras, las heridas crónicas de espesor completo crónicas constituyen una gran base de pacientes y a pesar de los avances tecnológicos de los tratamientos, las tasas de curación se mantienen por debajo del 50 % de tasa de éxitos (Kurd et al., 2009, Wound; Repair Regen, 17: 318-325). Se estima que estas heridas crónicas que no cicatrizan afectan a 7 millones de personas por año en los Estados Unidos con costes anuales que se aproximan a los 250.000 millones de dólares (Sen et al., 2009, Wound Repair Regen, 17: 763-771): Los pacientes que padecen cualquiera de estos tipos de lesiones se benefician de los tratamientos rápidos que resultan en el cierre completo y protección de las heridas. En particular, los pacientes quemados que reciben tarde los tratamientos a menudo sufren de cicatrices extensas que pueden resultar en efectos fisiológicos a largo plazo.

25 Se han hecho avances recientemente en los tratamientos para la cicatrización de heridas; sin embargo, la norma de oro, que se sigue empleando en clínica, es el injerto de piel de grosor parcial autólogo. Esto implica retirar un trozo de piel de un sitio quirúrgico secundario del paciente, estiramiento de la piel y re-aplicación del injerto en la herida o quemadura. Aunque este tratamiento da lugar a un resultado clínico razonable, si la herida es extensa, hay una limitación del número y tamaño de los sitios donantes. Los aloinjertos son una opción adicional, que se acompañan de la necesidad de fármacos inmunosupresores para evitar el rechazo inmunitario del injerto. Estas limitaciones han dado lugar por lo tanto al desarrollo de sustitutos dérmicos no celulares, que a menudo están comprendidos por un armazón polimérico. Los ejemplos incluyen Integra y Biobrane, y aunque dichos materiales dan como resultado una mejora en la cicatrización de las heridas en comparación con los controles no tratados (Leshner et al., 2011, J Pediatr Surg, 46: 1759-1763; Rahmanian et al, 2011, Burns, 37: 1343-1348), son caros de producir y dan lugar a resultados cosméticos relativamente pobres.

40 El documento US 2012/189583 A1 desvela composiciones que incluyen soluciones, geles y pastas fabricados a partir de membrana amniótica, membrana del cordón umbilical o ambos y métodos de utilización de estas composiciones para tratar afecciones del ojo.

El documento US 2007/071740 A1 desvela composiciones de membrana amniótica placentaria basadas en trozos, extractos, gelatina o estroma de MA (Membrana Amniótica).

45 El documento WO 03/024496 A1 describe la preparación de un biomaterial para la reparación tisular con una estructura de colágeno estabilizada.

50 Los recientes avances en ingeniería tisular han dado lugar a equivalentes cutáneos biológicos más complejos que pueden resultar en opciones de tratamiento de heridas más adecuadas para los pacientes. Los ejemplos incluyen productos tipo injerto celularizados, tales como Dermagraft, Apligraf, y TransCyte. Estos productos están comprendidos generalmente por un parche con armazón de polímero que se siembra con fibroblastos humanos y se cultivan *in vitro* antes de su aplicación. Lamentablemente, estos injertos también son caros de producir, y de manera similar a los aloinjertos, tienen los mismos inconvenientes inmunológicos expuestos en otro sitio del presente documento.

55 La fuente celular utilizada en terapias celulares para la cicatrización de heridas es una consideración importante que tiene implicaciones en el coste, velocidad y resultado de los tratamientos. Los queratinocitos humanos son quizá el tipo celular óptimo a emplear. Sin embargo, los queratinocitos autólogos y alógenos tienen los mismos inconvenientes que sus equivalentes injertos de piel autólogos o alógenos; es decir, sitios quirúrgicos secundarios y potencial para el rechazo, respectivamente. Además, las terapias celulares tienen obstáculos reguladores y financieros que superar antes de la comercialización.

60 Por lo tanto, existe la necesidad de un producto de ingeniería tisular y cicatrización de heridas que tenga una alta eficacia clínica, y que no necesite un componente celular, pero que a su vez mantenga la bioactividad de un tratamiento celular. La presente invención satisface esta necesidad no cumplida.

65

**Sumario de la invención**

La presente invención se refiere a una composición que comprende membrana amniótica y un armazón de hidrogel que comprende un polímero y un polímero sintético para su uso en la cicatrización de heridas y regeneración tisular como se define en las reivindicaciones adjuntas. En una realización, la composición comprende membrana amniótica en polvo. En una realización, la composición comprende membrana amniótica solubilizada (SAM).

En una realización, la composición está en forma de polvo. En una realización, la composición está en forma de ungüento. En una realización, la composición está en forma de pulverizador de aerosol.

En una realización, la membrana amniótica se deriva de una muestra de membrana amniótica obtenida de un mamífero. En una realización, el mamífero es un ser humano.

En una realización, el armazón comprende al menos un biopolímero seleccionado de entre el grupo que consiste en hialuronano y gelatina y al menos un polímero sintético seleccionado de entre el grupo que consiste en (met)acrilato - oligoláctido-PEO-oligoláctido-(met)acrilato, poli(etilenglicol) (PEO), poli(propilenglicol) (PPO), copolímeros PEO-PPO-PEO (Pluronic), poli(fosfazeno), poli(metacrilatos), poli(N-vinilpirrolidona), PL(G)A-PEO-PL(G)A, poli(etilenimina), y poli(etil glicol) diacrilato. En una realización, el armazón comprende un fotoiniciador. En una realización, el al menos un biopolímero está tiolado.

La presente invención se basa en un método para fabricar una composición que comprende membrana amniótica. El método comprende el aislamiento de una membrana amniótica de un mamífero; el lavado de la membrana amniótica; la liofilización de la membrana amniótica; y la trituración de la membrana amniótica para formar un polvo. En un aspecto, el método comprende adicionalmente la formación de una mezcla de polvo de membrana amniótica, pepsina, y una solución; la centrifugación de la muestra para formar un sobrenadante y un aglomerado y la retirada del sobrenadante, formando de esta manera una membrana amniótica solubilizada (SAM). En un aspecto, el mamífero es un ser humano. En un aspecto, el método comprende la descelularización de la membrana amniótica.

La presente invención incluye medios para la inducción de la cicatrización de heridas y la regeneración tisular en un sujeto que comprende la administración de una composición como se ha definido anteriormente en el presente documento en un sitio de tratamiento en el sujeto. En una realización, la composición comprende membrana amniótica en polvo. En una realización, la composición comprende membrana amniótica solubilizada (SAM).

En una realización, la composición está en forma de polvo. En una realización, la composición está en forma de ungüento. En una realización, la composición está en forma de pulverizador de aerosol.

En una realización, la membrana amniótica se deriva de una muestra de membrana amniótica obtenida de un mamífero. En una realización, el mamífero es un ser humano.

En una realización, el armazón comprende al menos un biopolímero seleccionado de entre el grupo que consiste en hialuronano y gelatina y al menos un polímero sintético seleccionado de entre el grupo que consiste en (met)acrilato - oligoláctido-PEO-oligoláctido-(met)acrilato, poli(etilenglicol) (PEO), poli(propilenglicol) (PPO), copolímeros PEO-PPO-PEO (Pluronic), poli(fosfazeno), poli(metacrilatos), poli(N-vinilpirrolidona), PL(G)A-PEO-PL(G)A, poli(etilenimina), y poli(etil glicol) diacrilato. En una realización, el armazón comprende un fotoiniciador. En una realización, el al menos un biopolímero está tiolado.

En una realización, el armazón está bioimpreso en el sitio de tratamiento. En una realización, el método comprende la administración de luz UV en el sitio de tratamiento para inducir la polimerización del armazón.

En una realización, la composición se aplica directamente en el sitio de tratamiento. En una realización, la composición se aplica en la superficie de un vendaje.

En una realización, el sitio de tratamiento está en una localización interna dentro del sujeto. En una realización, el sitio de tratamiento está en una localización interna dentro del sujeto.

**Breve descripción de los dibujos**

La siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención se entenderá mejor cuando se lea en conjunción con los dibujos adjuntos. Con el fin de ilustrar la invención, se muestran realizaciones en los dibujos que son preferidas actualmente. Se debería entender, sin embargo, que la invención no se limita a las disposiciones e instrumentales precisos de las realizaciones mostradas en los dibujos.

La Figura 1, que comprende la Figura 1A y la Figura 1B representa ilustraciones esquemáticas de métodos ejemplares para construir realizaciones de la presente invención. La Figura 1A ilustra un método ejemplar para fabricar una SAM derivada de tejido placentario humano. La Figura 1B es un esquema de materiales y métodos ejemplares utilizados en la construcción de un hidrogel.

La Figura 2 que comprende la Figura 2A y la Figura 2B, representa los resultados de los experimentos. La Figura 2A es un gráfico que ilustra la viabilidad de los queratinocitos primarios en distintos hidrogeles incluyendo los hidrogeles que comprenden SAM. La Figura 2B es un gráfico que ilustra la viabilidad de los fibroblastos en distintos hidrogeles incluyendo los hidrogeles que comprenden SAM.

La Figura 3 es una serie de imágenes que ilustra el transcurso de la cicatrización de la herida inducida por diferentes tratamientos. El Grupo I no fue tratado, salvo con un vendaje convencional. El Grupo II se trató con un hidrogel de ácido hialurónico (HA). El Grupo III se trató con un gel de HA que comprendía amnios (SAM).

La Figura 4 que comprende de la Figura 4A hasta la Figura 4D, representa los resultados de los experimentos que ilustran las características de la cicatrización de heridas en heridas que se dejan sin tratar, tratadas con un hidrogel de HA, o tratadas con un gel de HA que comprendía SAM. La Figura 4A es un gráfico que ilustra el porcentaje de herida remanente en cada grupo de tratamiento. La Figura 4B es un gráfico que ilustra la re-epitelización de la herida en cada grupo de tratamiento. La Figura 4C es un gráfico que ilustra el porcentaje de contracción en cada grupo de tratamiento. La Figura 4D es un gráfico que ilustra la relación de aspecto de la herida en cada grupo de tratamiento.

La Figura 5 que comprende de la Figura 5A a la Figura 5F, representa los resultados de los experimentos. De la Figura 5A a la Figura 5C son un conjunto de imágenes que representan la tinción con H/E de las áreas de la herida que demuestran los vasos presentes en el tejido en regeneración de las heridas no tratadas (Figura 5A), tratadas con hidrogel de HA (Figura 5B), y tratadas con hidrogel de HA que comprende SAM (Figura 5C). La Figura 5D es un gráfico que ilustra la cuantificación de densidad de vasos sanguíneos en las heridas sin tratar, heridas tratadas con hidrogel de HA, y heridas tratadas con hidrogel de HA + SAM. La Figura 5E es un gráfico que ilustra la cuantificación del tamaño de los vasos sanguíneos en las heridas sin tratar, heridas tratadas con hidrogel de HA, y heridas tratadas con hidrogel de HA + SAM. La Figura 5F es un gráfico que ilustra la distribución del tamaño de los vasos sanguíneos (grandes, medianos o pequeños) en las heridas sin tratar, heridas tratadas con hidrogel de HA, y heridas tratadas con hidrogel de HA + SAM.

La Figura 6 que comprende de la Figura 6A a la Figura 6F, es un conjunto de imágenes que ilustran los resultados de los experimentos. De la Figura 6A a la Figura 6C son imágenes que representan la tinción para el factor de von Willebrand y la  $\alpha$ -actina de músculo liso en el tejido en regeneración de las heridas no tratadas (Figura 6A), tratadas con hidrogel de HA (Figura 6B), y tratadas con hidrogel de HA que comprende SAM (Figura 6C). De la Figura 6D a la Figura 6F son imágenes que representan la tinción para la queratina 10 y Ki67 en el tejido en regeneración de las heridas no tratadas (Figura 6D), tratadas con hidrogel de HA (Figura 6E), y tratadas con hidrogel de HA que comprende SAM (Figura 6F).

La Figura 7 representa un conjunto de imágenes de cicatrización de heridas en el estudio porcino. Se crearon heridas cutáneas de espesor completo de 4,0 x 4,0 cm en los costados dorsales de cerdos Yorkshire y se dividieron en los siguientes grupos 1) No tratados; 2) Amnios en polvo; 3) gel de HA + amnios (HA-SAM); 4) parche de 3M; 5) Amniograft®; 6) GraftJacket®. El parche 3M se refiere a una composición de electrohilado experimental. Los grupos tratados con amnios en polvo y HA-SAM presentaban una aceleración significativa en la cicatrización de la herida y la re-epitelización, así como una reducción de la contracción en comparación con los grupos de control.

La Figura 8 que comprende la Figura 8A y la Figura 8B, representa los resultados de los experimentos. La Figura 8A es un gráfico que ilustra el espesor de la piel en las heridas sin tratar, heridas tratadas con hidrogel de HA, y heridas tratadas con hidrogel de HA + SAM. La Figura 8B es un gráfico que ilustra la proliferación tisular, según se mide por el número de células Ki67+ por área en las heridas sin tratar, heridas tratadas con hidrogel de HA, y heridas tratadas con hidrogel de HA + SAM.

La Figura 9 que comprende de la Figura 9A a la Figura 9E, representa los resultados de los experimentos. La Figura 9A es un gráfico que ilustra la expansión del hidrogel solo de HA y los hidrogeles de HA-SAM durante 24 horas. La Figura 9B es un gráfico que ilustra la liberación de proteína acumulada durante 14 horas. La Figura 9C es un gráfico que ilustra los ajustes de un modelo de liberación de primer orden que indica la liberación de proteína dependiendo de la concentración, respecto a la liberación de proteína observada. La Figura 9D es un gráfico que ilustra los ajustes del modelo de liberación de Hixson-Crowell que indica la descomposición del hidrogel, respecto a la liberación de proteína observada. La Figura 9E es un gráfico que ilustra los ajustes de modelo de Higuchi que indica la liberación de proteína mediada por difusión, respecto a la liberación de proteína observada.

La Figura 10 es un conjunto de imágenes que representan los resultados de los experimentos. Las imágenes representan la tinción del control sin tratar y de las heridas tratadas con hidrogeles solo de HA o hidrogeles de HA-SAM. Los especímenes se tiñeron con Azul Alciano, Colágenos de Herovici, Tricrómica de Masson, Rojo Picrosirio y de Verhoeff van Geison.

## 65 Descripción detallada

5 La presente invención se refiere en general a composiciones y medios para la inducción de la cicatrización de heridas y regeneración tisular. En una realización, la presente invención proporciona composiciones como se define en las reivindicaciones adjuntas, que comprenden membrana amniótica. En una realización, la composición comprende citocinas, proteínas de la matriz extracelular, y otros componentes que mejoran la cicatrización de heridas y la regeneración tisular.

En una realización, la composición comprende membrana amniótica en polvo. En una realización, la composición comprende membrana amniótica solubilizada (SAM).

10 En una realización, la presente invención proporciona medios para la aplicación de una composición que contiene membrana amniótica a un sujeto para inducir la cicatrización de heridas. Por ejemplo, en una realización, la composición se aplica directamente en la herida de un sujeto. En ciertas realizaciones, la composición se aplica en aerosol con un pulverizador, en gel, en crema o como un ungüento.

15 La presente invención se basa en un método para fabricar la composición que contiene membrana amniótica. El método comprende el aislamiento de la membrana amniótica de la placenta de un mamífero. En un aspecto, el método comprende la liofilización de la membrana amniótica. En otro aspecto, el método comprende la formación de un polvo de la membrana amniótica. En un aspecto, el método comprende la solubilización del polvo para formar la SAM. En un aspecto, el mamífero es un ser humano.

20 La presente invención también se basa en un armazón de ingeniería tisular basado en membrana amniótica, y métodos de fabricación del mismo. En una realización, el armazón es un hidrogel, en el que la membrana amniótica de SAM se incorpora dentro del gel. El armazón basado en membrana amniótica aumenta la regeneración tisular. El armazón basado en membrana amniótica reduce la contracción tisular. El armazón basado en membrana amniótica aumenta el desarrollo de vasos sanguíneos en el tejido en regeneración.

25 En una realización, la presente invención proporciona medios para la promoción de la regeneración tisular en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de un armazón basado en membrana amniótica. En una realización, esto comprende la bioimpresión de un hidrogel basado en membrana amniótica en un sitio que necesita la regeneración tisular en un sujeto. En una realización, esto comprende el inicio de la polimerización del hidrogel después de la aplicación en el sitio. En una realización, esto comprende la foto-reticulación del hidrogel basado en membrana amniótica. En otra realización, la membrana amniótica o SAM se incorpora dentro de un hidrogel basado en ácido hialurónico (HA) que, en ciertos casos se bioimpriime sobre las heridas y se fotorreticula en el sitio.

### 35 Definiciones

A menos de que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos que se utilizan en el presente documento tienen el mismo significado que entiende un experto en la técnica a la que la presente invención pertenece. Aunque se puede utilizar cualquiera de los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen los métodos y materiales preferidos.

Como se utilizan en el presente documento, cada uno de los términos siguientes tiene el significado asociado con él en esta sección.

45 Los artículos "un" y "una" se utilizan en el presente documento para referirse a uno o más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

"Aproximadamente" como se utiliza en el presente documento cuando se hace referencia a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal y similares, quiere decir que engloba variaciones del  $\pm 20\%$  o  $\pm 10\%$ , más preferentemente del  $\pm 5\%$ , incluso más preferentemente del  $\pm 1\%$ , y aún más preferentemente del  $\pm 0,1\%$  con respecto al valor especificado, según dichas variaciones sean apropiadas para llevar a cabo los métodos desvelados.

50 El término "anormal" cuando se utiliza en el contexto de organismos, tejidos, células o componentes de los mismos, se refiere a los organismos, tejidos, células o componentes de los mismos que se diferencian en al menos una característica observable o detectable (por ejemplo, la edad, tratamiento, hora del día, etc.) de los organismos, tejidos, células o componentes de los mismos que presentan la respectiva característica "normal" (esperada). Las características que son normales o esperadas para un tipo de célula o de tejido, puede ser anormal para un tipo de célula o tejido diferente.

60 Como se utiliza en el presente documento "biocompatible" se refiere a cualquier material, que cuando se implanta en un mamífero no provoca una respuesta adversa en el mamífero. Un material biocompatible, cuando se introduce en un individuo no es tóxico o perjudicial para ese individuo, ni induce un rechazo inmunológico del material en el mamífero.

65 Como se utiliza en el presente documento, un "cultivo", se refiere al cultivo o crecimiento de células, por ejemplo, células tisulares, en o sobre un medio nutritivo. Como es bien conocido por los expertos en la técnica del cultivo celular

o tisular, un cultivo celular comienza generalmente retirando las células o tejido de un ser humano u otro animal, disociando las células tratándolas con una enzima, y diseminando una suspensión de las células resultantes en una superficie plana, tal como el fondo de una placa de Petri. Ahí las células forman en general una fina capa de células llamada "monocapa" produciendo un material tipo glicoproteico que produce que las células se adhieran al plástico o cristal de la placa de Petri. Se coloca entonces una capa de medio de cultivo, que contiene los nutrientes adecuados para el crecimiento celular encima de la monocapa, y se incuba el cultivo para promover el crecimiento de las células.

El término "descelularizado" o "descelularización" como se utiliza en el presente documento se refiere a una bioestructura (por ejemplo, un órgano o parte de un órgano), del que se ha retirado el contenido celular y tisular dejando una infraestructura acelular intacta. Los órganos tales como el riñón están compuestos por distintos tejidos especializados. Las estructuras tisulares especializadas de un órgano, o parénquima proporcionan la función específica asociada con el órgano. La red fibrosa de soporte del órgano es el estroma. La mayoría de los órganos tienen una estructura de estroma compuesta por tejido conjuntivo no especializado que soporta el tejido especializado. El procedimiento de descelularización retira el tejido especializado dejando la red compleja tridimensional de tejido conjuntivo. La infraestructura de tejido conjuntivo está compuesta primariamente por colágeno. La estructura descelularizada proporciona un sustrato biocompatible en el que se pueden infundir diferentes poblaciones celulares. Las bioestructuras descelularizadas pueden ser rígidas, o semirrígidas, que tienen capacidad para alterar su forma. Ejemplos de los órganos descelularizados útiles en los aspectos de la presente invención incluyen, pero no se limita a, el corazón, riñón, hígado, páncreas, bazo, vejiga, uréter y uretra, cartilago, hueso, cerebro, médula espinal, nervios periféricos.

La expresión "derivado de" se utiliza en el presente documento para decir que se origina de una fuente específica.

Una "enfermedad" es un estado de la salud de un animal en el que el animal no puede mantener la homeostasis, y en el que si la enfermedad no se mejor entonces la salud del animal continúa deteriorándose.

Por el contrario, un "trastorno" en un animal es un estado de salud en el que el animal es capaz de mantener la homeostasis, pero en el que el estado de salud del animal es menos favorable que si estuviera en ausencia del trastorno. Si se deja sin tratar, un trastorno no causa necesariamente una disminución adicional del estado de la salud del animal.

Una enfermedad o trastorno se "alivia" si la gravedad de un síntoma de la enfermedad o trastorno, la frecuencia con la que dicho síntoma es experimentado por el paciente, o ambas, se reducen.

Una "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" de un compuesto es la cantidad de un compuesto que es suficiente para proporcionar un efecto beneficioso al sujeto al que se administra el compuesto. Una "cantidad eficaz" de un vehículo de suministro es la cantidad suficiente para unir o suministrar eficazmente un compuesto.

Como se utiliza en el presente documento, "endógeno" se refiere a cualquier material de o producido dentro de un organismo, célula o sistema.

"Exógeno" se refiere a cualquier material introducido desde o producido fuera de un organismo, célula o sistema.

Como se utiliza en el presente documento, "composición de matriz extracelular" incluye tanto las fracciones solubles como no solubles o cualquier parte de las mismas. La fracción no soluble incluye las proteínas de la ECM secretadas y componentes biológicos que se depositan sobre el soporte o armazón. La fracción soluble se refiere a un medio de cultivo en el que las células se han cultivado y en el que las células han secretado agentes activos e incluye las proteínas y componentes biológicos no depositados sobre el armazón. Se pueden recolectar ambas fracciones, y opcionalmente se puede procesar adicionalmente, y utilizarse individualmente o en combinación en una variedad de aplicaciones como se describe en el presente documento.

Como se utiliza en el presente documento, el término "gel" se refiere a una estructura polimérica tridimensional que por sí misma es insoluble en un líquido en particular, pero es capaz de absorber y retener grandes cantidades de agua para formar una estructura estable, a menudo blanda y plegable, pero siempre hasta un grado u otra forma retentiva. Cuando el líquido es agua, se hace referencia al gel como hidrogel. A menos de que se establezca expresamente otra cosa, el término "gel" se utilizará a lo largo de la presente solicitud para referirse tanto a estructuras poliméricas que han absorbido un líquido distinto de agua y a estructuras poliméricas que han absorbido agua, siendo fácilmente evidente para los expertos en la técnica a partir del contexto si la estructura polimérica simplemente es un "gel" o un "hidrogel".

Como se utiliza en el presente documento, un "injerto" se refiere a una célula, tejido u órgano que se implanta en un individuo, normalmente para sustituir, corregir o de otra manera superar un defecto. Un injerto puede comprender adicionalmente un armazón. El tejido u órgano puede consistir en células que se originen del mismo individuo; se hace referencia a este injerto en el presente documento mediante los siguientes términos que se pueden intercambiar: "autoinjerto", "trasplante autólogo", "implante autólogo" e "injerto autólogo". Se hace referencia en el presente documento a un injerto que comprende células de un individuo genéticamente diferente de la misma especie mediante

los siguientes términos que se pueden intercambiar: "aloinjerto", "trasplante alógeno", "implante alógeno", e "injerto alógeno". Se hace referencia a un injerto de un individuo a su gemelo idéntico como un "isoinjerto", un "trasplante singénico", un "implante singénico" o un "injerto singénico". Un "xenoinjerto", "trasplante xenogénico", o "implante xenogénico" se refiere a un injerto de un individuo a otro de una especie diferente.

5 Como se utiliza en el presente documento se entiende por "factores de crecimiento" los siguientes factores no limitantes que incluyen, pero no se limitan a, hormona de crecimiento, eritropoyetina, trombopoyetina, interleucina 3, interleucina 6, interleucina 7, factor estimulante de colonias de macrófagos, factor de ligando c-kit/células madre, ligando de osteoprotegerina, insulina, factores de crecimiento tipo insulina, factor de crecimiento epidérmico (EGF),  
10 factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento de nervios, factor neurotrófico ciliar, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante (TGF-beta), factor de crecimiento del hepatocito (HGF) y proteína morfogenética ósea a concentraciones de entre niveles de picogramos/ml a miligramos/ml.

15 "Células nativas", como se utiliza en el presente documento significa células que son nativas, residentes, o endógenas de la membrana placentaria, es decir, células que no se han añadido exógenamente a la membrana placentaria.

Los términos "paciente", "sujeto", "individuo", y similares se utilizan de manera intercambiable en el presente documento, y se refieren a cualquiera animal o célula del mismo sea *in vitro* o *in situ*, susceptible a los métodos descritos en el presente documento. En ciertas realizaciones no limitantes, el paciente, sujeto o individuo es un  
20 mamífero, y en otras realizaciones el mamífero es un ser humano.

"Foto-reticulación" se refiere a la formación de enlaces que une una cadena de polímero a otra al exponerse a la luz de una longitud de onda apropiada. Por ejemplo, dos polímeros conjugados a un grupo fotorreactivo pueden foto-reticularse covalentemente mediante la formación de un enlace covalente entre los grupos fotorreactivos.  
25

Un "fotoiniciador" incluye normalmente un agente que forma radicales libres cuando se iluminan por longitudes de onda apropiadas. Clases de compuestos ejemplares no limitantes útiles como fotoiniciadores incluyen compuestos de carbonilo aromáticos (por ejemplo, derivados de benzoína, benzicetales, derivados de acetofenona, hidroxialquilfenonas) y cetonas aromáticas (por ejemplo, benzofenona y tioxantona). Ejemplos no limitantes de  
30 fotoiniciadores incluyen Esacure de Lamberti spa, benzofenona, dimetoxifenil acetofenona, 2,2-dimetoxi, 2-fenilacetofenona y 2,2-dietoxiacetofenona, 1-[4-(2-hidroxi-etoxi)-fenil]-2-hidroxi-2-metil-1-propano-1-ona, etil eosina, eosina Y, fluoresceína, 2,2-dimetoxi, 2-fenilacetofenona, 2-metil, 2-fenilacetofenona, 12959, canforquinona, rosa de bengala, azul de metileno, eritosina, floxima, tionina, riboflavina, y verde de metilo. Otros fotoiniciadores más incluyen 1-(4-Fluorfenil)-2-metil-2-morfolino-1 -propanona, 1,7-bis(9-acridinil)heptano, 1 -cloro-4-propoxitioxantona, 1-Hidroxi ciclohexil fenil cetona, 2,2-Di etoxi acetofenona, 2,3,4,4'-Tetrahidroxi Benzofenona, 2,3,4-Trihidroxibenzofenona, 2,4,6-Trimetil benzoil difenil fosfina óxido, 2,4,6-Trimetilbenzofenona, 2/4-Dietiltioxantona, 2/4-Isopropiltioxantona, 2-Bencil-2-(dimetilamino)-1 -[4-(4-morfolinil)fenil] -1 -butanona, 2-clorotioxantona, 2-Dimetil-aminoetilbenzoato, 2-Etilhexil-4-dimetilaminobenzoato, 2-Hidroxi-2-metil-fenil-propan-1-ona, 2-Hidroxi-4'-hidroxietoxi-2-metilpropiofenona, 2-Isopropiltioxantona, 2-Metil Benzofenona, 2-Metil-1-[4-(metiltio)fenil]-2-morfolinopropanona-1,4-(4-Metilfeniltiofenil)-fenilmetanona, 4,4'-Difluoro benzofenona, 4,4'-Dimetoxi benzofenona, 4-cloro benzofenona, 4-Metil acetofenona, 4-Metil benzofenona, 4-fenilbenzofenona, Benzil dimetil cetil, Benzofenona, Benzofenona hidrazona, Bis(p-tolil) odonio hexafluorofosfato, Dimetil Sebacato, Difenil yodonio Hexafluorofosfato, Etil (2,4,6-trimetilbenzoil)fenilfosfinato, Etil-4-(dimetilamino)benzoato, Metil o-benzoil benzoato, Metil fenil glioxilato, N,N,N',N'-Tetraetil-4,4-diaminobenzofenona, feniltribromometilsulfona, óxido de acilfosfina (APO) y óxido de bisacilfosfina (BAPO), 1-[4-(2-Hidroxi-etoxi)-fenil]-2-  
45 hidroxi-2-metil-1-propano-1-ona, 2,2-Dimetoxi-1,2-difeniletan-1-ona, hidroxi-ciclohexil-fenil-cetona, metilbenzoilformato, 2-[2 oxo-2 fenil-acetoxi-etoxi]etil éster del ácido oxi-fenil-acético, [2-hidroxi-etoxi]-etil éster de oxi-fenil-acético, óxido de alfa-dimetoxi-alfa-fenilacetofenona, 2-Benzil-2-(dimetilamino)-1 -[4-(4-morfolinil)fenil]-1 -butanona, difenil (2,4,6-trimetilbenzoil)-fosfina, fosfina óxido, bis(eta 5-2,4-ciclopentadien-1-il), bis[2,6-difluoro-3-(1H-pirrol-1 -il)fenil]titanio, yodonio, (4-metilfenil)[4-(2-metilpropil)fenil]-hexafluorofosfato(1-), óxido de bis(2,6-dimetoxibenzoil)-2,4,4-trimetil pentilfosfina. Los fotoiniciadores también comprenden compuestos relacionados y  
50 derivados de estos compuestos.

"Proliferación" se utiliza en el presente documento para referirse a la reproducción o multiplicación de formas similares, especialmente de células. Es decir, la proliferación engloba la producción de un número mayor de células y puede medirse, entre otras cosas, por recuento simple del número de células, midiendo la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina en la célula, y similares.  
55

"Progresión de o a lo largo del ciclo celular" se utiliza en el presente documento para referirse al proceso por el que una célula se prepara para y/o entra en mitosis y/o meiosis. La progresión a lo largo del ciclo celular incluye la progresión a lo largo de la fase G1, la fase S, la fase G2, y la fase M.  
60

Como se utiliza en el presente documento, "armazón" se refiere a una estructura, que comprende un material biocompatible que proporciona una superficie adecuada para la adherencia y proliferación de células. Un armazón puede proporcionar adicionalmente una estabilidad mecánica y soporte. Un armazón puede tener un aspecto o forma particular de manera que tiene influencia o delimita un aspecto o forma tridimensional que asume la población de células en proliferación. Dichos aspectos o formas incluyen, pero no se limitan a, películas (por ejemplo, una forma  
65

con dos dimensiones significativamente mayores que la tercera dimensión), lazos, cordones, láminas, discos planos, cilindros, esferas, formas 3-dimensionales amorfas, etc.

5 Como se utiliza en el presente documento, un compuesto "sustancialmente purificado" es un componente que está libre esencialmente de otros componentes. Por lo tanto, una célula sustancialmente purificada se refiere a una célula que se ha purificado de otros tipos celulares que están normalmente asociados en su estado natural de origen.

10 Un tratamiento "terapéutico" es un tratamiento administrado a un sujeto que presenta signos de patología, con el fin de disminuir o eliminar estos signos.

Como se utiliza en el presente documento, "tratamiento de una enfermedad o trastorno" significa la reducción de la frecuencia con la que un síntoma de la enfermedad o trastorno es experimentado por un paciente. Enfermedad y trastorno se utilizan de manera intercambiable en el presente documento.

15 Como se utiliza en el presente documento, "ingeniería tisular" se refiere al procedimiento de generación de un tejido ex vivo para su uso en la reposición de tejidos o reconstrucción. La ingeniería tisular es un ejemplo de "medicina regenerativa" que engloba estrategias para la reparación o reposición de los tejidos u órganos por la incorporación de células, genes u otros bloques de construcción biológicos, junto con materiales y tecnologías biomodificados.

20 Como se utiliza en el presente documento, las expresiones "injerto tisular" y "reconstrucción tisular" se refieren ambas a la implantación de un injerto en un individuo para tratar o aliviar un defecto tisular tal como un defecto en un pulmón o un defecto de tejido blando.

25 "Trasplante" se refiere a un entramado biocompatible o un tejido, órgano o célula, donante que se va a trasplantar. Un ejemplo de un trasplante puede incluir, pero no se limita a células o tejido cutáneo, médula ósea, y órganos sólidos tales como el corazón, páncreas, riñón, pulmón, e hígado.

30 El término "herida" como se utiliza en el presente documento se refiere a todo tipo de lesiones tisulares, incluyendo las infligidas por la cirugía y un trauma, incluyendo quemaduras, así como las lesiones de las afecciones médicas crónicas, tales como aterosclerosis, enfermedad vascular, o diabetes. Las composiciones descritas en el presente documento son útiles para el tratamiento de todo tipo de heridas, incluyendo heridas en tejidos internos y externos. Los vendajes para heridas tienen la intención de tratar las distintas etiologías de heridas que afectan las tres capas de la piel (es decir, epidermis, dermis y capas subcutáneas).

35 Intervalos: A lo largo de la presente divulgación, se pueden presentar distintos aspectos de la invención en un formato de intervalo. Se debería entender que la descripción en formato de intervalo simplemente es por conveniencia y brevedad y no debería considerarse como una limitación inflexible del alcance de la invención. En consecuencia, la descripción de un intervalo se debería considerar que tiene desvelados específicamente todos los posibles subintervalos, así como los valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, la descripción de un intervalo tal como desde 1 a 6 se debería considerar que tiene desvelados los subintervalos tales como desde 1 a 3, desde 1 a 4, desde 1 a 5, desde 2 a 4, desde 2 a 6, desde 3 a 6, etc., así como los números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.

#### 45 Descripción

La presente invención proporciona composiciones para su uso en la cicatrización de heridas y la regeneración tisular. La invención se describe ahora con los detalles particulares.

#### 50 Composición

La presente invención proporciona una composición que comprende membrana amniótica para su uso en aplicaciones para la cicatrización de heridas y la regeneración tisular. La membrana amniótica, o amnios, es un tejido fino que forma la pared del saco amniótico. Durante la gestación, la membrana amniótica rodea y protege el embrión en desarrollo. La membrana amniótica comprende una membrana de base espesa y una matriz del estroma avascular. Los parches de membrana amniótica se han implementado como vendajes para heridas cutáneas, ya que se cree que la membrana amniótica contiene componentes que ayudan a la cicatrización de heridas.

60 La presente invención se basa en un método para fabricar la composición. En una realización, el método de la invención comprende el aislamiento de la membrana amniótica de una placenta de un mamífero, por ejemplo, un ser humano. En algunos casos, es beneficioso que la membrana amniótica se obtenga de la misma especie que el sujeto que se va a tratar eventualmente con el derivado del producto basado en membrana amniótica. En una realización, la membrana amniótica está separada de la membrana coriónica. Como entenderán los expertos en la técnica, se puede utilizar cualquier método de separación o disección de la membrana amniótica del resto de la placenta. En una realización, el método comprende la retirada de cualquiera de los coágulos sanguíneos y sangre de la membrana aislada. En una realización, el método comprende el lavado de la membrana. La membrana se puede lavar o aclarar en cualquier solución adecuada. Por ejemplo, en una realización, la membrana se lava en agua estéril. En otra



realización, la membrana se lava en solución salina estéril. En otra realización, la membrana se lava en un medio de cultivo celular adecuado.

5 En una realización, la membrana amniótica se descelulariza utilizando cualquier método de descelularización conocido en la técnica. En un método ejemplar, el procedimiento de descelularización comprende una serie de extracciones secuenciales. Una característica de este procedimiento de extracción es que se pueda evitar una extracción poco cuidadosa que pueda alterar o destruir la compleja infraestructura de la bioestructura. La primera etapa implica la retirada de los desechos celulares y la solubilización de la membrana celular. Esto continúa con la solubilización de los componentes citoplásmicos nucleares.

10 En la presente invención, la membrana amniótica no se descelulariza. En algunos aspectos, puede ser beneficioso no descelularizar la membrana amniótica. Sin el deseo de quedar ligados por ninguna teoría en particular, se cree que la descelularización de la membrana amniótica puede retirar distintos componentes de la membrana que son importantes para las aplicaciones en cicatrización de heridas.

15 En una realización, el método comprende la liofilización de la membrana amniótica. La liofilización, secado por congelación, de la membrana amniótica se puede llevar a cabo mediante cualquier método conocido en la técnica, véase, por ejemplo, la Pat. de EE. UU. N.º 4.001.944. Por ejemplo, la membrana puede congelarse rápidamente en etanol al 100% y hielo seco, luego liofilizarse a -20 °C en un liofilizador estéril hasta secarse.

20 En una realización de la presente invención, la membrana amniótica se corta en trozos. La membrana se puede cortar utilizando un par de tijeras, un cuchillo, un par de fórceps, un escalpelo, un microtomo, y similares. En otra realización, la membrana amniótica se muele, pica o tritura en un polvo fino. La formación del polvo derivado de la membrana amniótica se puede llevar a cabo por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, en una realización, los trozos de la membrana se colocan en una trituradora de impacto criogénica. Una trituradora de impacto criogénica ejemplar es la Spex SamplePrep 6870 Freezer/Mill®, que permite el ciclado de las fases de enfriamiento y fases de molienda durante la trituración de las muestras.

30 En una realización, la membrana se digiere adicionalmente. Por ejemplo, en una realización, la membrana amniótica pulverizada se co-incuba con pepsina en una solución adecuada. En una realización, la solución es de HCl. En una realización, se centrifuga el digerido, en el que se retira el sobrenadante formando de esta manera la SAM de la presente invención. En algunos casos, se ajusta el pH de la SAM. En una realización, se ajusta el pH de la SAM a un pH de aproximadamente 7. La SAM se puede almacenar a una temperatura adecuada hasta que sea necesario su uso. En algunas realizaciones, la SAM se puede mezclar con un tampón isotónico o medio de cultivo celular adecuado. Los tampones adecuados incluyen, pero no se limitan a, solución salina tampón de fosfato (PBS), solución salina, MOPS, HEPES, solución salina equilibrada de Hank, y similares. Un medio de cultivo celular adecuado incluye, pero no se limita a, RPMI 1640, medio de Fisher, Iscove, McCoy, Dulbecco, y similares. En ciertas realizaciones, la presente invención incluye membrana amniótica en polvo, que en ciertos casos puede combinarse con un tampón adecuado. Es decir, en ciertas realizaciones, la composición de la presente invención comprende membrana amniótica en polvo.

40 En una realización, el armazón comprende una SAM. En ciertas realizaciones, la composición comprende una crema, líquido, gel, pulverizador, ungüento, o similar que comprende la membrana amniótica en polvo o SAM descrita en el presente documento.

45 La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden membrana amniótica. Como se ha descrito en otro sitio del presente documento, la presente invención se basa en el hallazgo de que la membrana amniótica aumenta la cicatrización de heridas y la regeneración tisular. Las formulaciones se pueden emplear en mezclas con excipientes convencionales, es decir, sustancias de vehículo orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables para la administración en las heridas o el sitio de tratamiento. Las composiciones farmacéuticas se pueden esterilizar y mezclar, si se desea, con agentes auxiliares, por ejemplo, sustancias lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales o tampones que tengan influencia sobre la presión osmótica, colorantes, y/o aromáticas y similares. También se pueden combinar si se desea con otros principios activos, por ejemplo, otros agentes analgésicos.

55 Como se utiliza en el presente documento, los "ingredientes adicionales" incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: excipientes; agentes de superficie activos; agentes dispersantes; diluyentes inertes; agentes de granulación y desintegración; agentes aglomerantes; agentes lubricantes, agentes colorantes, conservantes, composiciones degradables fisiológicamente tales como gelatina; vehículos y disolventes acuosos, vehículos y disolventes oleosos; agentes suspensores, agentes dispersantes o humectantes; cargas; agentes emulsionantes, antioxidantes, antibióticos, agentes antifúngicos, agentes estabilizantes; y materiales poliméricos o hidrófobos farmacéuticamente aceptables. Otros "ingredientes adicionales" que pueden incluirse en las composiciones farmacéuticas de la invención se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en Genaro, ed. (1985, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA).

65 La composición de la invención puede comprender un conservante desde aproximadamente un 0,005% a un 2,0% por peso total de la composición. El conservante se utiliza para evitar la descomposición en el caso de exposición a contaminantes del entorno. Ejemplos de conservantes útiles de acuerdo con la invención incluyen, pero no se limitan

a los seleccionados de entre el grupo que consiste en alcohol bencílico, ácido sórbico, parabenos, imidourea y combinaciones de los mismos. Un conservante particularmente preferido es una combinación de aproximadamente un 0,5% a un 2,0% de alcohol bencílico y un 0,05% a un 0,5% de ácido sórbico.

- 5 En una realización, la composición incluye un antioxidante y un agente quelante que inhibe la degradación de uno o más componentes de la SAM. Los antioxidantes preferidos para algunos compuestos son BHT, BHA, alfa-tocoferol y ácido ascórbico en el intervalo preferido desde aproximadamente un 0,01% a un 0,3% y más preferentemente BHT en el intervalo de desde un 0,03% a un 0,1% por peso por el peso total de la composición. Preferentemente, el agente quelante está presente en una cantidad de desde un 0,01% a un 0,5% por peso por el peso total de la composición.
- 10 Los agentes quelantes particularmente preferidos incluyen las sales de edetato (por ejemplo, el edetato disódico) y el ácido cítrico en el intervalo de peso de aproximadamente un 0,01% a un 0,20% y más preferentemente en el intervalo de un 0,02% a un 0,10% por peso por el peso total de la composición. El agente quelante es útil para quelar los iones metálicos en la composición que pueden ser perjudiciales para la vida de almacenamiento de la formulación. Aunque el BHT y el edetato disódico son agentes antioxidantes y quelantes particularmente preferidos para algunos compuestos, otros agentes antioxidantes y quelantes equivalentes y adecuados pueden, por lo tanto, ser sustituidos como conocerán los expertos en la técnica.

- Las suspensiones líquidas pueden prepararse utilizando métodos convencionales para conseguir una suspensión de SAM en un vehículo acuoso u oleoso. Los vehículos acuosos incluyen, por ejemplo, agua y solución salina isotónica.
- 20 Los vehículos oleosos incluyen, por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico, aceites vegetales tales como de aceite de maní, oliva, sésamo o coco, aceites vegetales fraccionados, aceites minerales tales como parafina líquida. Las suspensiones líquidas pueden comprender adicionalmente uno o más ingredientes incluyendo, pero sin limitarse a, agentes suspensores, agentes dispersantes o humectantes, agentes emulsionantes, demulcentes, conservantes, tampones, sales, saborizantes, agentes colorantes, y agentes edulcorantes. Las suspensiones oleosas pueden comprender adicionalmente un agente espesante. Los agentes suspensores conocidos incluyen, pero no se limitan a, sirope de sorbitol, grasas hidrogenadas comestibles, alginato sódico, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto, goma arábiga, y derivados de la celulosa tales como la carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetil
- 25 celulosa. Los agentes dispersantes o humectantes conocidos incluyen, pero no se limitan a, los fosfátidos de origen natural tal como lecitina, productos de condensación de un óxido de alquileno con un ácido graso, con un alcohol alifático de cadena larga, con un éster parcial derivado de un ácido graso y hexitol, o con un éster parcial derivado de un ácido graso y un anhídrido de hexitol (por ejemplo, estearato de polietileno, heptadecaetilenoxietanol, polioxietileno sorbitol monooleato, y polietileno sorbitán monooleato, respectivamente). Los agentes emulsionantes conocidos incluyen, pero no se limitan a, lecitina y goma arábiga. Los conservantes conocidos incluyen, pero no se limitan a, metil, etil, o n-propil-para-hidroxibenzoatos, ácido ascórbico y ácido sórbico.

- 35 Se pueden preparar soluciones líquidas de SAM en disolventes acuosos u oleosos sustancialmente de la misma manera que las suspensiones líquidas, siendo la diferencia primaria que el principio activo se disuelve, más que suspenderse en el disolvente. Como se utiliza en el presente documento, un líquido "oleoso" es el que comprende una molécula líquida que contiene carbono y que presenta un carácter menos polar que el agua. Las soluciones líquidas de la composición farmacéutica de la invención pueden comprender cada uno de los componentes descritos con respecto a las suspensiones líquidas, entendiéndose que los agentes suspensores no ayudarán necesariamente a la disolución del principio activo en el disolvente. Los disolventes acuosos incluyen, por ejemplo, agua y solución salina isotónica. Los disolventes oleosos incluyen, por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico, aceites vegetales tales como de aceite de maní, oliva, sésamo o coco, aceites vegetales fraccionados, aceites minerales tales como parafina líquida.

- Una composición farmacéutica de la invención también se puede preparar, empaquetar, o vender en forma de una emulsión de aceite en agua o una emulsión de agua en aceite. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal tal como aceite de oliva o maní, un aceite mineral tal como parafina líquida, o una combinación de estos. Dichas composiciones pueden comprender adicionalmente uno o más agentes emulsionantes tales como las gomas de origen natural tales como goma arábiga o goma de tragacanto, fosfátidos de origen natural tales como fosfátidos de soja o lecitina, ésteres o ésteres parciales derivados de las combinaciones de ácidos grasos y anhídrido de hexitol tales como monooleato de sorbitán, y productos de condensación de dichos ésteres parciales con óxido de etileno tal como monooleato de polioxietileno sorbitán. Estas emulsiones también pueden contener ingredientes adicionales que incluyen, por ejemplo,
- 50 agentes edulcorantes o saborizantes.

- Los métodos para la impregnación o revestimiento de un material con una composición química se conocen en la técnica, e incluyen, pero no se limitan a los métodos para el depósito o unión de una composición química en una superficie, los métodos de incorporación de una composición química en la estructura de un material durante la síntesis del material (es decir, tal como con un material degradable fisiológicamente), y los métodos para la absorción de una solución o suspensión acuosa u oleosa en un material absorbente con o sin el secado posterior.

- En ciertos casos, un beneficio de la composición de la presente invención es que tiene la capacidad de rellenar heridas irregulares y profundas. Por lo tanto, en una realización, la composición farmacéutica puede aplicarse tópicamente en una herida o en un sitio que necesite la regeneración tisular.

Las formulaciones adecuadas para la administración tópica incluyen, pero no se limita a, preparaciones líquidas o semilíquidas tales como linimentos, lociones, emulsiones de aceite en agua, o agua en aceite, tales como cremas, ungüentos o pastas, y soluciones o suspensiones. Las formulaciones que se pueden administrar por vía tópica pueden comprender, por ejemplo, desde aproximadamente un 1% a aproximadamente un 10% (p/p) de principio activo, aunque la concentración del principio activo puede ser tan alta como el límite de solubilidad del principio activo en el disolvente. Las formulaciones para la administración tópica pueden comprender adicionalmente uno o más de los ingredientes adicionales descritos en el presente documento.

Se pueden utilizar potenciadores de la permeabilidad. Estos materiales aumentan la tasa de penetración de fármacos a través de la piel. Los potenciadores típicos de la técnica incluyen etanol, monolaurato de glicerol, PGML (monolaurato de polietilenglicol), dimetilsulfóxido, y similares. Otros potenciadores incluyen el ácido oleico, oleil alcohol, etoxidiglicol, laurocapram, ácidos alcanocarbóxicos, dimetilsulfóxido, lípidos polares, o N-metil-2-pirrolidona.

Un vehículo aceptable para el suministro tópico de algunas de las composiciones de la invención puede contener liposomas. La composición de los liposomas y su uso se conocen en la técnica (por ejemplo, véase la Patente de EE. UU. N.º 6.323.219).

En realizaciones alternativas, las formulaciones adecuadas para la administración tópica pueden combinarse opcionalmente con otros ingredientes tales como adyuvantes, antioxidantes, agentes quelantes, tensioactivos, agentes espumantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes moduladores de viscosidad, agentes tampón, conservantes y similares. En otra realización el potenciador de permeabilidad o penetración se incluyen en la composición y es eficaz para mejorar la penetración percutánea de los componentes de la membrana amniótica en y a través del estrato córneo con respecto a una preparación que carezca del potenciador de permeabilidad. Son conocidos distintos potenciadores de la permeabilidad incluyendo el ácido oleico, oleil alcohol, etoxidiglicol, laurocapram, ácidos alcanocarbóxicos, dimetilsulfóxido, lípidos polares, o N-metil-2-pirrolidona, por lo expertos en la técnica. En otro aspecto, la composición puede comprender adicionalmente un agente hidrotópico, que funciona aumentando la alteración de la estructura del estrato córneo, y de esta manera permitir el aumento del transporte a través del estrato córneo. Son conocidos distintos agentes hidrotópicos, tales como al alcohol isopropílico, propilenglicol, o sulfonato sódico xileno, por lo expertos en la técnica.

Las formulaciones adecuadas para la administración tópica se deberían aplicar en una cantidad eficaz para efectuar los cambios deseados. Como se utiliza en el presente documento "cantidad eficaz" significará una cantidad suficiente para cubrir la región de superficie de piel en la que se desea un cambio. Un compuesto activo debería estar presente en una cantidad de aproximadamente un 0,0001% a aproximadamente un 15% por peso del volumen de la composición. Más preferentemente, debería estar presente en una cantidad de desde aproximadamente 0,0005% a aproximadamente un 5% de la composición; más preferentemente, debería estar presente en una cantidad de desde aproximadamente un 0,001% a aproximadamente un 1% de la composición. Dichos compuestos pueden ser de origen sintético o natural.

En otra realización, la composición farmacéutica que comprenden la membrana amniótica en polvo o SAM se puede aplicar en un vendaje o apósito, que entonces se aplica a la herida o sitio de tratamiento en un sujeto. Por ejemplo, en una realización, se empapa un vendaje en una solución líquida o una suspensión líquida que comprende la membrana amniótica en polvo o SAM. En otra realización, se aplica un ungüento que comprende membrana amniótica en polvo o SAM en una superficie de un apósito o vendaje.

En otra realización, la composición farmacéutica comprende una solución en aerosol o atomizada o una suspensión que comprende la membrana amniótica en polvo o SAM. Dichas formulaciones en aerosol, cuando se dispersan, tienen preferentemente un tamaño medio de partícula o gotícula en el intervalo de desde aproximadamente 0,1 a aproximadamente 200 nanómetros y pueden comprender adicionalmente uno o más de los ingredientes adicionales descritos en el presente documento. Los ejemplos de formulaciones descritos en el presente documento no son exhaustivos y se entiende que la invención incluye modificaciones adicionales de estas y otras formulaciones no descritas en el presente documento, pero que son conocidas por los expertos en la técnica.

#### Armazones basados en membrana amniótica

La presente invención proporciona un armazón de ingeniería tisular basado en membrana amniótica útil en la cicatrización de heridas y la regeneración tisular. Por ejemplo, en una realización, la membrana amniótica en polvo o SAM se incorpora dentro del armazón. En otra realización la membrana amniótica en polvo o SAM se aplica la superficie de un armazón. El armazón de la invención puede ser de cualquier tipo conocido en la técnica. Ejemplos no limitantes de dicho armazón incluyen un hidrogel, un armazón electrohilado, espuma, una malla, una lámina, un parche y una esponja.

En una realización, el armazón puede comprender cualquier polisacárido, incluyendo glicosaminoglicanos (GAG) o glucosaminoglicanos, con una viscosidad, peso molecular adecuados, y otras propiedades deseables. Se entiende por glicosaminoglicanos cualquier glicano (es decir, un polisacárido) que comprende una cadena de polisacárido no ramificada con una unidad disacáridica repetida, una de las cuales siempre es un amino azúcar. Estos compuestos

como clase tienen una carga altamente negativa, son fuertemente hidrófilos, y se denominan comúnmente mucopolisacáridos. Este grupo de polisacáridos incluyen heparina, sulfato de heparán, sulfato condroitina, sulfato de queratán, y ácido hialurónico. Estos GAG se encuentran predominantemente en las superficies celulares y en la matriz extracelular. También se entiende por glucosaminoglicanos cualquier glicano (es decir, un polisacárido) que contiene predominantemente derivados monosacáridicos en los que el grupo hidroxilo alcohólico se ha sustituido por un grupo amino u otro grupo funcional tal como sulfato o fosfato. Un ejemplo de un glucosaminoglicano es el poli-N-acetil glucosaminoglicano, al que se hace referencia comúnmente como quitosano. Los polisacáridos ejemplares que pueden ser útiles en la presente invención incluyen, dextrano, heparán, heparina, ácido hialurónico, alginato, agarosa, carragenano, amilopectina, amilosa, glicógeno, almidón, celulosa, quitina, quitosano y distintos polisacáridos sulfatados tales como el sulfato de heparán, sulfato de condroitina, sulfato de dextrano, sulfato de dermatán, o sulfato de queratán.

(a) Hidrogeles

- 15 En una realización, la presente invención proporciona un hidrogel que comprende membrana amniótica en polvo o SAM. Los hidrogeles pueden absorber en general una gran cantidad de fluido y, en equilibrio, están compuestos normalmente por un 60-90% de fluido y solo un 10-30% de polímero. En una realización preferida, el contenido de agua de un hidrogel es aproximadamente del 70-80%. Los hidrogeles son particularmente útiles debido a la biocompatibilidad inherente de la red polimérica reticulada (Hill-West, et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5967-5971). La biocompatibilidad del hidrogel se puede atribuir a la hidrofilia y la capacidad de embeber grandes cantidades de fluidos biológicos (Brannon-Peppas. Preparation and Characterization of Cross-linked Hydrophilic Networks in Absorbent Polymer Technology, Brannon-Peppas y Harland, Eds. 1990, Elsevier: Amsterdam, pp 45-66; Peppas y Mikos. Preparation Methods and Structure of Hydrogels in Hydrogels in Medicine and Pharmacy, Peppas, Ed. 1986, CRC Press: Boca Raton, Fla., pp 1-27). Los hidrogeles se pueden preparar reticulando biopolímeros hidrófilos o polímeros sintéticos. Ejemplos de hidrogeles formados por reticulado físico o químico de biopolímeros hidrófilos, incluyen, pero no se limitan a, hialuronanos, quitosanos, alginatos, colágeno, dextrano, pectina, carragenano, polilisina, gelatina o agarosa (véase, W. E. Hennink y C. F. van Nostrum, 2002, Adv. Drug Del. Rev. 54, 13-36 y A. S. Hoffman, 2002, Adv. Drug Del. Rev. 43, 3-12). Estos materiales consisten en cadenas de armazón de alto peso molecular hechas con polisacáridos o polipéptidos lineales o ramificados. Ejemplos de hidrogeles basados en el reticulado de polímeros sintéticos incluyen, pero no se limitan a (met)acrilato-oligoláctido-PEO-oligoláctido-(met)acrilato, poli(etilenglicol) (PEO), poli(propilenglicol) (PPO), copolímeros PEO-PPO-PEO (Pluronic), poli(fosfazeno), poli(metacrilatos), poli(N-vinilpirrolidona), PL(G)A-PEO-PL(G)A, poli(etilenimina), etc., (véase, S. Hoffman, 2002, Adv. Drug Del. Rev. 43, 3-12). En algunas realizaciones, el hidrogel comprende diacrilato de poli(etilenglicol) (PEGDA).
- 35 En una realización, el hidrogel comprende al menos un biopolímero. En otras realizaciones, el armazón de hidrogel comprende adicionalmente al menos dos biopolímeros. En otras realizaciones más, el armazón de hidrogel comprende adicionalmente al menos un biopolímero y al menos un polímero sintético. En una realización, el hidrogel de la presente invención comprende ácido hialurónico, gelatina y PEGDA.
- 40 En una realización, los componentes del hidrogel de la invención se han modificado. Por ejemplo, en una realización, se pueden modificar los monómeros con anhídrido metacrílico (AM). En otra realización, los componentes del hidrogel se han modificado con una química de fotopolimerización con tioleno para producir componentes tiolados. Por ejemplo, en una realización, el hidrogel comprende ácido hialurónico tiolado y gelatina tiolada.
- 45 Los hidrogeles se parecen estrechamente con la matriz extracelular viva natural (Ratner y Hoffman. Synthetic Hydrogels for Biomedical Applications in Hydrogels for Medical and Related Applications, Andrade, Ed. 1976, American Chemical Society: Washington, D.C., pp 1-36). Los hidrogeles también se pueden hacer que sean degradables *in vivo* incorporando polímeros PLA, PLGA, o PGA. Además, los hidrogeles se pueden modificar con fibronectina, laminina, vitronectina, o, por ejemplo, con RGD para la modificación de la superficie, que puede favorecer la adhesión y proliferación celular (Heungsoo Shin, 2003, Biomaterials 24:4353-4364; Hwang et al, 2006 Tissue Eng. 12:2695-706). Además, la alteración de los pesos moleculares, estructuras en bloques, uniones degradables, y modos de reticulado pueden influenciar en la fuerza, elasticidad y propiedades de degradación de los hidrogeles actuales (Nguyen y West, 2002, Biomaterials 23(22):4307-14; Ifkovits y Burkick, 2007, Tissue Eng. 13(10):2369-85).
- 55 Los hidrogeles también se pueden modificar con grupos funcionales para la unión covalente de una variedad de proteínas (por ejemplo, colágeno) o compuestos tales como agentes terapéuticos. Los agentes terapéuticos que se pueden unir a la matriz incluyen, pero no se limitan a, analgésicos, anestésicos, antifúngicos, antibióticos, antiinflamatorios, antihelmínticos, antidotos, antieméticos, antihistamínicos, antihipertensivos, antimaláricos, antimicrobianos, antipsicóticos, antipiréticos, antisépticos, antiaritmicos, antituberculosos, antitusivos, antivirales, fármacos cardioactivos, catárticos, agentes quimioterápicos, un agente de creación de imágenes coloreado o fluorescente, corticoides (tales como esteroides), antidepresivos, depresivos, auxiliares de diagnóstico, diuréticos, enzimas, expectorantes, hormonas, hipnóticos, minerales, suplementos nutricionales, parasimpaticomiméticos, suplementos de potasio, sensibilizadores a la radiación, un radioisótopo, sedantes, sulfonamidas, estimulantes, simpaticomiméticos, tranquilizantes, antiinfecciosos urinarios, vasoconstrictores, vasodilatadores, vitaminas, derivados de xantina, y similares. El agente terapéutico también pueden ser otras moléculas orgánicas pequeñas, entidades aisladas naturalmente o sus análogos, agentes organometálicos, metales quelados o sales metálicas,

fármacos basados en péptidos, o agentes de unión o direccionamiento a un receptor peptídico o no peptídico. Se contempla que la unión del agente terapéutico a la matriz puede ser mediante un enlazador sensible a proteasas u otro enlazador biodegradable. Las moléculas que se pueden incorporar en la matriz del hidrogel incluyen, pero no se limitan a, vitaminas y otros suplementos nutricionales; glicoproteínas (por ejemplo, colágeno); fibronectina; péptidos y proteínas, carbohidratos (tanto simple como complejos); proteoglicanos; antígenos; oligonucleótidos (ADN y/o ARN en sentido y antisentido); anticuerpos (por ejemplo, contra agentes infecciosos, tumores, fármacos u hormonas); y reactivos de terapia genética.

En ciertas realizaciones, se pueden utilizar uno o más agentes de reticulado multifuncionales como restos reactivos que unan covalentemente los biopolímeros o polímeros sintéticos. Dichos agentes de reticulado bifuncionales pueden incluir glutaraldehído, epóxidos (por ejemplo, bis-oxiranos), dextrano oxidado, p-azidobenzoil hidrazida, éster de N-[ $\alpha$ -maleimidoacetoxi]succinimida, p-azidofenil glioxal monohidrato, disulfuro de bis-[ $\beta$ -(4-azidosalicilamido)etilo], suberato de bis[sulfosuccinimidilo], propionato de ditiobis[succinimidilo], suberato de disuccinimidilo, hidrocloreuro de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS) y otros reactivos de reticulado bifuncional conocidos por los expertos en la técnica. Los expertos en la técnica deberían apreciar que las propiedades mecánicas del hidrogel están influenciadas en gran manera por el tiempo de reticulado y la cantidad de agentes de reticulado.

En otra realización que utiliza un agente de reticulado, se pueden utilizar materiales poliacrilados, tales como el triacrilato de trimetilpropano etoxilado (20), como un agente de reticulado fotoactivado no específico. Los componentes de una mezcla de reacción ejemplar incluyen un hidrogel termorreversible mantenido a 39°C, monómeros de poliacrilato, tal como el triacrilato de trimetilpropano etoxilado (20), un foto-iniciador, tal como eosina Y, agentes catalíticos, tales como 1-vinil-2-pirrolidinona, y trietanolamina. La exposición continua de esta mezcla de reacción a una luz de larga longitud de onda (> 498 nm) produciría una red de hidrogel reticulada.

En una realización, el hidrogel comprende un agente de curado sensible a UV que inicia la polimerización del hidrogel. Por ejemplo, en una realización, un hidrogel comprende el fotoiniciador 4-(2-hidroxi-2-propil)cetona. En una realización, la polimerización se induce con la 4-(2-hidroxi-2-propil)cetona al aplicarle luz UV. Otros ejemplos de agentes de curado sensibles a UV incluyen 2-hidroxi-2-metil-1-fenilpropan-2-ona, 4-(2-hidroxi-2-propil)fenil (2-hidroxi-2-fenil-2-hidroxi-2-propil)cetona, 2,2-dimetoxi-2-fenil-acetofenona 1-[4-(2-Hidroxi-2-propil)fenil]-2-hidroxi-2-metil-1-propano-1-ona, 1-hidroxiciclohexilfenil cetona, óxido de trimetil benzoil difenil fosfina y mezclas de los mismos.

La matriz de hidrogel reticulada estabilizada de la presente invención se puede estabilizar y potenciar adicionalmente mediante la adición de uno o más agentes de potenciación. Se entiende por "agente de potenciación" o "agente estabilizante cualquier compuesto añadido a la matriz de hidrogel, además de los componentes de alto peso molecular, que potencie la matriz de hidrogel proporcionando ventajas adicionales de estabilidad y funcionales. Los agentes potenciadores adecuados, que se mezclan con los componentes de alto peso molecular y se dispersan dentro de la matriz del hidrogel, incluyen muchos de los aditivos descritos anteriormente en conexión con la matriz termorreversible expuesta anteriormente. El agente de potenciación puede incluir cualquier compuesto, específicamente compuestos polares, que, cuando se incorporan en la matriz de hidrogel reticulada, potencian la matriz de hidrogel proporcionando ventajas adicionales de estabilidad y funcionales.

Los agentes de potenciación preferidos para su uso con la matriz de hidrogel reticulada estabilizada incluye aminoácidos polares, análogos de aminoácido, derivados de aminoácido, colágeno intacto, y quelantes de cationes divalentes, tal como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o sales de los mismos. Se entiende que los aminoácidos polares incluyen tirosina, cisteína, serina, treonina, asparagina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutámico, arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos polares preferidos son L-cisteína, ácido L-glutámico, y L-arginina. Las concentraciones adecuadas de cada agente potenciador particular preferido son las mismas que se han señalado anteriormente en conexión con la matriz de hidrogel termorreversible. Los aminoácidos polares, EDTA, y mezcla de los mismos, son agentes potenciadores preferidos. Los agentes potenciadores pueden añadirse a la composición de matriz antes o durante el reticulado de los componentes de alto peso molecular.

Los agentes potenciadores son particularmente importantes en la matriz de hidrogel bioactiva reticulada estabilizada debido a las propiedades inherentes que promueven dentro de la matriz. La matriz de hidrogel presenta una bioactividad intrínseca que será más evidente mediante las realizaciones adicionales descritas posteriormente en el presente documento. Se cree que la bioactividad intrínseca es una función de la estereoquímica única de las macromoléculas reticuladas en presencia del potenciador y los aminoácidos polares fortalecedores, así como otros agentes potenciadores.

En una realización, la membrana amniótica en polvo o SAM se incorpora en el hidrogel. Por ejemplo, la membrana amniótica en polvo o SAM se puede añadir a la solución de hidrogel antes de la gelación o polimerización del gel. La membrana amniótica en polvo o SAM se puede añadir a la solución de hidrogel en cualquier cantidad deseada para producir un efecto deseado. En una realización, la relación de SAM respecto a la solución de hidrogel varía desde aproximadamente 10:1 a 1:10. En otra realización, la relación de SAM respecto a la solución de hidrogel varía desde aproximadamente 5:1 a 1:5. En otra realización, la relación de SAM respecto a la solución de hidrogel es de 1:1. De esta manera, los componentes de la membrana amniótica se encuentran intercalados dentro del hidrogel. En otra

realización, el hidrogel polimerizado está revestido con una cantidad eficaz de membrana amniótica en polvo o SAM. En algunas realizaciones, el hidrogel permite la difusión de los componentes de la membrana amniótica en y a lo largo del hidrogel.

5 (b) *Armazones electrohilados*

En una realización, la membrana amniótica en polvo o SAM de la presente invención puede incorporarse en matrices electrohiladas nanofibras biocompatibles. En algunas realizaciones, la membrana amniótica en polvo o SAM está mezclada con un polímero sintético, tal como óxido de poli(etileno) (PEO) para producir un almacén de ingeniería tisular.

Los almacenes de la invención pueden producirse en una variedad de formas. En una realización ejemplar, el almacén puede producirse por electrohilado. El electro hilado es un procedimiento de atomización de un fluido conductor que aprovecha las interacciones entre un campo electrostático y el fluido conductor. Cuando un campo electrostático externo se aplica en un fluido conductor (por ejemplo, una solución de polímero semi-diluido o una mezcla de polímeros), se forma una gota cónica suspendida, de manera que la tensión superficial de la gota está en equilibrio con el campo eléctrico. La atomización electrostática se produce cuando el campo electrostático es lo suficientemente fuerte para superar la tensión de superficie del líquido. La gota de líquido se vuelve entonces inestable y un chorro delgado se eyecta de la superficie de la gota. Cuando alcanza una diana con toma de tierra, el material se puede recolectar como una red interconectada relativamente fina, es decir, de fibras de pequeño diámetro. Las películas (o membranas) resultantes de estas fibras de pequeño diámetro tienen una relación de área de superficie muy grande respecto al volumen y tamaños de poro pequeños. Se proporciona una descripción detallada de un aparato de electrohilado en los documentos de Zong, et al, 2002 *Polymer* 43: 4403-4412; Rosen et al, 1990 *Ann Plast Surg* 25: 375-87; Kim, K., *Biomaterials* 2003, 24: 4977-85; Zong, X., 2005 *Biomaterials* 26: 5330-8. Después del electrohilado, se puede utilizar una extrusión y moldeado para dar forma adicional a los polímeros. Para modular la organización de las fibras en almacenes de polímero fibroso alineado, han sido satisfactorio el uso de electrodos con patrón, colectores de tambor de alambre o métodos de post-procesado tales como un estiramiento uniaxial. El documento de Zong, X., 2005 *Biomaterials* 26: 5330-8; Katta, P., 2004 *Nano Lett* 4: 2215-2218; Li, D., 2005 *Nano Lett* 5: 913-6.

La membrana amniótica que comprende una solución proteica que se va a electrohilar se puede producir en una de varias maneras. Un método implica la adición de solución SAM a un disolvente apropiado. Este procedimiento puede conseguirse en un conjunto de jeringa o se puede cargar posteriormente en un conjunto de jeringa. Otro método implica adquirir soluciones disponibles en el mercado o polímeros disponibles en el mercado y se disuelven para crear soluciones de polímero. Por ejemplo, se puede adquirir óxido de poli(etileno) (PEO) en Sigma (Sigma, St. Louis, Mo.), se puede adquirir poli-L-láctido (PLLA) en DuPont (Wilmington, Del), se puede adquirir poli(láctido-co-glicólido) en Ethicon (Somerville, N. J.). Los componentes adicionales del almacén polimérico de la invención, tal como las células y biomoléculas, también están disponibles en el mercado en los proveedores.

La solución proteica que comprende la membrana amniótica utilizada para formar el almacén se disuelve primero en un disolvente. El disolvente puede ser cualquier disolvente que sea capaz de disolver los componentes de la membrana amniótica. Los disolventes típicos incluyen un disolvente seleccionado de entre N,N-dimetil formamida (DMF), tetrahidrofurano (THF), cloruro de metileno, dioxano, etanol, hexafluoroisopropanol (HFIP), cloroformo, 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFP), ácido acético glacial, agua y combinaciones de los mismos.

La solución proteica puede contener opcionalmente una sal que cree un efecto de exceso de carga para facilitar el procedimiento de electrohilado. Ejemplos de sales incluyen NaCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KIO<sub>3</sub>, KCl, MgSO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, CaCl<sub>2</sub> o mezclas de estas sales.

La solución proteica que forma la conductividad del fluido tiene una concentración proteica en el intervalo de aproximadamente un 1 a aproximadamente un 80% pp, más preferentemente de aproximadamente un 8 a aproximadamente un 60% pp.

El campo eléctrico creado en el procedimiento de electrohilado está preferentemente en el intervalo de desde aproximadamente 5 a aproximadamente 100 kilovoltios (kV), más preferentemente aproximadamente 10 a aproximadamente 50 kV. La tasa de alimentación del fluido conductor en la hilera (o electrodo) preferentemente está en el intervalo de desde aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1000 microlitros/min, más preferentemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 250 microlitros/min.

Las hileras únicas o múltiples se sitúan en una plataforma que sea capaz de ajustarse, variando la distancia entre la plataforma y el sustrato del colector con toma de tierra. La distancia puede ser cualquier distancia que permita que se evapore el disolvente esencialmente de manera completa antes del contacto del polímero con el sustrato colector con toma de tierra. En una realización ejemplar, la distancia puede variar desde 1 cm a 25 cm. Aumentando la distancia entre el sustrato colector con toma de tierra y la plataforma se producen en general fibras más delgadas.

En los casos en los que el electrohilado se necesita un mandril rotatorio, el mandril se une mecánicamente a un motor, a menudo mediante un portabrocas. En una realización ejemplar, el motor rota el mandril a una velocidad de entre

aproximadamente 1 revolución por minuto (rpm) a aproximadamente 500 rpm. En una realización ejemplar, la velocidad de rotación del motor es de entre aproximadamente 200 rpm a aproximadamente 500 rpm. En otra realización ejemplar, se puede utilizar la velocidad de rotación del motor de entre aproximadamente 1 rpm a aproximadamente 100 rpm.

5 Se describen en el presente documento realizaciones adicionales o modificaciones del procedimiento y aparato de electrohilado.

10 La invención incluye también combinaciones de materiales naturales, combinaciones de materiales sintéticos, y combinaciones de materiales tanto naturales como sintéticos. Por ejemplo, la membrana amniótica en polvo o SAM de la invención se pueden combinar con materiales naturales, materiales sintéticos, materiales tanto naturales como sintéticos para producir los armazones de la invención. Ejemplos de combinaciones incluyen, pero no se limitan a: mezclas de diferentes tipos de colágeno (por ejemplo, de Tipo I con Tipo II, Tipo I con Tipo III, Tipo II con Tipo III, etc.); mezclas de uno o más tipos de colágeno con fibrinógeno, trombina, elastina, PGA, PLA, y polidioxanona; y mezclas de fibrinógeno con uno o más tipos de colágeno, trombina, elastina, PGA, PLA, y polidioxanona.

15 El material electroprocesado de la presente invención puede ser el resultado del electroprocesamiento de materiales naturales, materiales sintéticos, o combinaciones de los mismos. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a aminoácidos, péptidos, péptidos desnaturalizados tales como gelatina de colágeno desnaturalizado, polipéptidos, proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos, glicoproteínas, lipoproteínas, glicolípidos, glicosaminoglicanos y proteoglicanos.

20 Algunos materiales preferidos que se van a electroprocesar son materiales de matriz extracelular de origen natural y mezclas de materiales de matriz extracelular de origen natural, incluyendo, pero sin limitarse a colágeno, fibrina, fibrinógeno, trombina, elastina, laminina, fibronectina, ácido hialurónico, sulfato de 4-condroitina, sulfato de 6-condroitina, sulfato de dermatan, sulfato de heparina, heparina y sulfato de queratán, y proteoglicanos. Los materiales especialmente preferidos para el electroprocesado incluyen el colágeno, fibrina, fibrinógeno, trombina, fibronectina, y combinaciones de los mismos. Algunos colágenos que se utilizan incluyen, pero no se limitan a colágenos tipo I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII, XIV, XV, XVI, XVII, XVIII, y XIX. Algunos colágenos preferidos incluyen los tipos I, II, y III. Estas proteínas pueden tener cualquier forma, incluyendo, pero sin limitarse a formas nativas y desnaturalizadas. Otros materiales preferidos para el electroprocesado son carbohidratos tales como los polisacáridos (por ejemplo, celulosa y sus derivados), quitina, quitosano, ácido alginico, y alginatos tales como alginato cálcico y alginato sódico. Estos materiales pueden aislarse de productos vegetales, humanos u otros organismos o células o fabricados sintéticamente. Algunos materiales especialmente preferidos para el electroprocesado incluyen el colágeno, fibrinógeno, trombina, fibrina, fibronectina, y combinaciones de los mismos. También se incluyen extractos en bruto de tejido, material de matriz extracelular, extractos de tejido no naturales, o materiales de la matriz extracelular (es decir, extractos de tejido canceroso), solos o en combinación. También se pueden electroprocesar extractos de material biológico, que incluyen, pero no se limitan a células, tejidos, órganos, y tumores.

30 El colágeno y fibrinógeno pueden electrohilarse cada uno para producir fibras que tengan patrones de bandas repetidos a lo largo de la longitud de las fibras. Estos patrones son observables, por ejemplo, por microscopía electrónica de transmisión, y son típicas de los producidos por procesos naturales. En algunas realizaciones, el patrón de bandas observado en las fibras de colágeno electrohiladas es el mismo que el producido por las células *in vivo*. En algunas realizaciones, el patrón en bandas en el fibrinógeno electrohilado es el mismo que el fibrinógeno que se encuentra en los coágulos normales formados *in vivo*. Aunque sin desear quedar unidos por cualquier teoría en particular, se cree que las bandas aparentes a lo largo de las fibras de colágeno natural resultan del patrón helicoidal de las cadenas proteicas del colágeno, mientras que las bandas en el fibrinógeno *in vivo* resultan del empaquetado próximo de moléculas de fibrina individuales en una configuración apilada. En algunas de estas realizaciones, las composiciones están compuestas de redes fibrosas más que de las redes características de los coágulos de fibrina. Adicionalmente, en algunas realizaciones, el fibrinógeno electroprocesado no es soluble en agua, a diferencia del fibrinógeno nativo.

40 La invención incluye todas las composiciones híbridas naturales-sintéticas que resultan del electroprocesado de cualquier material. Los materiales que cambian en la composición o estructura antes, durante o después del electroprocesado están dentro del alcance de la invención.

55 Se tiene que entender que estos materiales electroprocesados pueden combinarse con otros materiales y/o sustancias en la formación de las composiciones de la presente invención. Por ejemplo, en algunas realizaciones un péptido electroprocesado se combina con un adyuvante para aumentar la inmunogenicidad cuando se implantan subcutáneamente. Los materiales electroprocesados en algunas realizaciones se preparan a pH muy básicos o ácidos (por ejemplo, electroprocesando a partir de una solución que tiene un pH específico) para conseguir el mismo efecto. Como otro ejemplo, una matriz electroprocesada, que contiene células, puede combinarse con un polímero electroprocesado biológicamente compatible para estimular el crecimiento y división de las células en la matriz electroprocesada.

60 Los materiales sintéticos electroprocesados para su uso en el almacén incluyen cualquiera de los materiales

preparados mediante los métodos de síntesis artificial, procesamiento, aislamiento, o fabricación. Los materiales sintéticos son preferentemente biológicamente compatibles para la administración *in vivo* o *in vitro*. Dichos polímeros incluyen pero no se limitan a los siguientes: poli(uretanos), poli(siloxanos) o siliconas, poli(etileno), poli(vinilpirrolidona), poli(2-hidroxi etil metacrilato), poli(N-vinil pirrolidona), poli(metil metacrilato), alcohol poli(vinílico), ácido poli(acrílico), poli(acrilamida), acetato de poli(etilen-co-vinilo), poli(etilenglicol), ácido poli(metacrílico), ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), poli(láctido-co-glicólido) (PLGA), nilones, poliamidas, polianhídridos, alcohol poli(etileno-co-vinilo) (EVOH), policaprolactona, acetato de poli(vinilo) (PVA), hidróxido de polivinilo, óxido de poli(etileno) (PEO) y poliortoésteres o cualquier otro polímero sintético similar que se pueda desarrollar que sea biológicamente compatible. Algunos materiales sintéticos preferidos incluyen PLA, PGA, copolímeros de PLA y PGA, policaprolactona, acetato de poli(etileno-co-vinilo), EVOH, PVA, y PEO. Los polímeros con restos catiónicos también son preferidos en algunas realizaciones. Ejemplos de dichos polímeros incluyen, pero no se limitan a, poli(alil amina), poli(etilenimina), poli(lisina), y poli(arginina). Los polímeros pueden tener cualquier estructura molecular incluyendo, pero sin limitarse a, estructura lineal, ramificada, de injerto, en bloque, de estrella, de peine y dendríméricas. Las matrices se pueden formar por fibras electrohiladas, gotas en electroaerosol, electropulverizadas o electroespurriadas, polvos o partículas electroprocesadas, o una combinación de las anteriores.

Seleccionando diferentes materiales naturales y sintéticos, o combinaciones de los mismos, se modifican muchas características del armazón. Las propiedades de la matriz comprendidas en un material electroprocesado y una sustancia se pueden ajustar. Además, la selección de materiales para el electroprocesado puede afectar la permanencia de una matriz implantada. Por ejemplo, muchas matrices hechas con fibrinógeno o fibrina electroprocesados puede degradarse más rápidamente mientras que muchas matrices hechas de colágeno son más duraderas y muchas otras matrices hechas de materiales electroprocesados son aún más duraderas. Por lo tanto, por ejemplo, la incorporación de polímeros sintéticos duraderos (por ejemplo, PLA, PGA) aumenta la durabilidad y la fuerza estructural de matrices electroprocesadas de soluciones de fibrinógeno en algunas realizaciones. El uso de matrices hechas de materiales naturales electroprocesados tal como proteínas derivadas de maíz, trigo, patata, sorgo, tapioca, arroz, arrurruz, sagú, soja, guisante, girasol, maní, gelatina y similares también minimizan en rechazo o la respuesta inmunitaria contra una matriz implantada. En consecuencia, la selección de materiales para el electroprocesado y el uso en el suministro de sustancias está influenciada por el uso deseado.

En realizaciones en las que la matriz contiene sustancias que se han liberado de la matriz, los componentes sintéticos electroprocesados, tales como las sustancias biocompatibles, pueden modular la liberación de sustancias desde una composición electroprocesada. Por ejemplo, las estructuras en capas o laminadas se pueden utilizar para controlar el perfil de liberación de sustancias. También se pueden utilizar estructuras sin capas, en cuyo caso la liberación se controla por la estabilidad relativa de cada componente de la construcción. Por ejemplo, las estructuras en capas compuestas de materiales electroprocesados alternativos se preparan electroprocesando secuencialmente diferentes materiales en una diana. Las capas externas son, por ejemplo, ajustadas para disolverse más rápido o más lento que las capas internas. Se pueden suministrar múltiples agentes mediante este método, opcionalmente a velocidades de liberación diferentes. Las capas se pueden ajustar para proporcionar un perfil de liberación multicinético, complejo de un único agente a lo largo del tiempo. Utilizando combinaciones de lo anterior se proporciona la liberación de múltiples sustancias liberadas, cada una con su propio perfil. Son posibles perfiles complejos.

Los componentes naturales tales como sustancias biocompatibles se pueden utilizar para modular la liberación de materiales electroprocesados o de sustancias de una composición electroprocesada. Por ejemplo, un fármaco o serie de fármacos u otros materiales o sustancias se van a liberar de una manera controlada se pueden electroprocesar en una serie de capas. En una realización, una capa está compuesta de fibrinógeno electroprocesado más un fármaco, la próxima capa PLA más un fármaco, una tercera capa está compuesta de policaprolactona más un fármaco. La construcción en capas se puede implantar, y según se disuelven o se rompen, el fármaco (o fármacos) se libera a su vez según se erosiona cada capa sucesiva. En algunas realizaciones, se utilizan estructuras sin capas y la liberación se controla mediante la estabilidad relativa de cada componente de la construcción.

En algunas realizaciones el propio material electroporado puede proporcionar un efecto terapéutico. Ejemplos no limitantes de un material que tiene un efecto terapéutico es fibrinógeno, fibrina electroprocesados, o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, la trombina convierte el fibrinógeno en fibrina. La fibrina ayuda en la detención del sangrado (hemostasia). La fibrina es un componente de la matriz provisional que se deposita durante los estadios tempranos de la cicatrización y también puede promover el crecimiento del sistema vascular en la región adyacente. De muchas maneras, la fibrina es un promotor natural de la cicatrización. En algunas realizaciones, el fibrinógeno electroprocesado también ayuda a la cicatrización. Cuando se pone en contacto con una herida de un paciente, dicho material electroprocesado proporciona las mismas propiedades de cicatrización que la fibrina.

### 60 (c) Método para la formación de matrices o armazones

Puede darse forma a un armazón biocompatible utilizando métodos tales como, por ejemplo, fundición en disolvente, moldeado por compresión, extracción de filamentos, entramado, lixiviado, tejido, espumado, electrohilado y revestimiento. En la fundición en disolvente de una o más proteínas en un disolvente apropiado, se funde como una estructura de liberación con un patrón ramificado. Después de la evaporación del disolvente, se obtiene una fina película. En el moldeado por compresión, se presiona un polímero a presiones hasta de 2106 kilogramos por



centímetro cuadrado en un patrón apropiado. La extracción de filamentos implica la extracción del polímero fundido y entramado implica la formación de una malla comprimiendo las fibras en un material similar al fieltro. En la lixiviación, se disemina una solución que contiene dos materiales en una forma cercana a la forma final del órgano artificial. A continuación, se utiliza un disolvente para disolver uno de los componentes, dando como resultado la formación de poros. (Véase la Pat. de EE. UU. N.º 5.514.378 de Mikos).

Puede darse forma al armazón en cualquier número de configuraciones deseables para satisfacer cualquier número de sistemas totales, geometría, o restricciones de espacio. Por ejemplo, en el uso del armazón para la reconstrucción de vejiga, uretra, válvula o vaso sanguíneo, se puede dar forma a la matriz o armazón para conformar las dimensiones y formas de todo o parte del tejido. Se puede dar forma al armazón con diferentes formas y tamaños para conformar los órganos de pacientes de diferentes tamaños. Para las vejigas, se debería dar forma al armazón de manera que después de su biodegradación, la vejiga reconstruida resultante puede colapsarse cuando esté vacía de una manera similar a la vejiga natural. También se puede dar forma a la matriz o armazón de otras maneras para acomodarse a las necesidades especiales del paciente.

En una realización, los armazones se siembran con una o más poblaciones de células para formar una construcción de órgano artificial. La construcción de órgano artificial puede ser autóloga, cuando las poblaciones celulares se derivan del propio tejido del sujeto, o alógena, cuando las poblaciones celulares se derivan de otro sujeto dentro de la misma especie que el paciente. La construcción del órgano artificial también puede ser xenógeno, cuando las poblaciones celulares diferentes se derivan de una especie de mamífero que sea diferente del sujeto. Por ejemplo, las células pueden derivarse de órganos de mamíferos tales como seres humanos, monos, perros, gatos, ratones, ratas, vacas, caballos, cerdos, cabras y ovejas.

Las células se pueden aislar de entre varias fuentes, que incluyen, por ejemplo, biopsias de sujetos vivos y órganos completos recuperados de cadáveres. Las células aisladas son preferentemente células aisladas, obtenidas en biopsias del sujeto que se pretende que sea el receptor. Por ejemplo, una biopsia de músculo esquelético del brazo, antebrazo o extremidades inferiores, o músculo liso del área tratada con anestésico local con una pequeña cantidad de lidocaína inyectada por vía subcutánea y que se expande en un cultivo. La biopsia se puede obtener utilizando una aguja de biopsia, una aguja de acción rápida que hace que el procedimiento sea rápido y simple.

Las células se pueden aislar utilizando técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el tejido u órgano se puede disgregar mecánicamente y/o tratar con enzimas digestivas y/o agentes quelantes que debiliten las conexiones entre las células vecinas haciendo posible dispersar el tejido en una suspensión de células individuales sin una rotura celular apreciable. La disociación enzimática puede conseguirse picando el tejido y tratando el tejido picado con cualquiera de varias enzimas digestivas sean solas o en combinación. Estas incluyen, pero no se limitan a, tripsina, quimiotripsina, colagenasa, elastasa, y/o hialuronidasa, DNasa, pronasa y dispasa. La destrucción mecánica también se puede conseguir mediante varios métodos que incluyen, pero no se limitan a, rascado de la superficie del órgano, el uso de picadoras, mezcladoras, filtros, homogeneizadores, celdas de presión, o en sonicadores.

Los tipos celulares preferidos incluyen, pero no se limitan a, células uroteliales, células mesenquimáticas, especialmente células musculares esqueléticas o lisas, miocitos (células madre musculares), fibroblastos, condrocitos, adipocitos, fibromioblastos, y células ectodérmicas, que incluyen células dúctiles y cutáneas, hepatocitos, células de los islotes, células presentes en el intestino, y otras células parenquimáticas, osteoblastos y otras células formadoras de hueso o cartílago. En algunos casos, puede ser deseable incluir células nerviosas. En otros casos, puede ser deseable incluir células madre.

Una vez que el tejido se ha reducido a una suspensión de células individuales, la suspensión se puede fraccionar en subpoblaciones a partir de las que se obtienen los elementos celulares. Esto también se puede conseguir utilizando técnicas convencionales para la separación celular que incluyen, pero no se limitan a, clonación y selección de tipos celulares específicos, destrucción selectiva de células no deseadas (selección negativa), separación basada en la aglutinación celular diferencial en la población mixta, procedimientos de congelación-descongelación, propiedades de adherencia diferenciales de las células en la población mixta, filtración, centrifugación convencional y zonal, elutriado por centrifugación (centrifugación contracorriente), separación por unidad de gravedad, distribución contracorriente, electroforesis y clasificación celular activada por fluorescencia.

El fraccionamiento celular también puede ser deseable, por ejemplo, cuando el donante tiene enfermedades tales como el cáncer o metástasis de otros tumores en el tejido deseado. Una población celular se puede clasificar para separar las células malignas u otras células tumorales de las células normales no cancerosas. Las células normales no cancerosas aisladas por una o más técnicas de clasificación, se pueden utilizar entonces para la reconstrucción orgánica.

Las células aisladas se pueden cultivar *in vitro* para aumentar el número de células disponibles para el revestimiento del armazón biocompatible. El uso de células alógenas, y más preferentemente de células autólogas, se prefiere para evitar el rechazo del tejido. Sin embargo, si se produce una respuesta inmunológica en el sujeto después del implante del órgano artificial, el sujeto se puede tratar con agentes inmunosupresores tales como ciclosporina o FK506 para reducir la probabilidad de rechazo. En ciertas realizaciones, pueden revestirse el armazón biocompatible con células

químicas, o células de un animal transgénico.

- 5 Las células aisladas pueden transfectarse antes del revestimiento con un material genético. El material genético útil puede ser, por ejemplo, de secuencias genéticas que sean capaz de reducir o eliminar una respuesta inmunitaria en el huésped. Por ejemplo, se puede suprimir la expresión de antígenos en la superficie celular tal como antígenos del complejo de histocompatibilidad clase I y clase II. Esto puede permitir que las células trasplantadas tengan reducida la oportunidad de ser rechazadas por el huésped. Además, la transfección también se podría utilizar para el suministro genético.
- 10 Las células aisladas pueden ser normales o modificadas genéticamente para proporcionar una función adicional o normal. Se pueden utilizar métodos de modificación celular genética con vectores retrovíricos, polietilenglicol, u otros métodos conocidos por los expertos en la técnica. Estos incluyen la utilización de vectores de expresión que transportan y expresan moléculas de ácido nucleico en las células. (Véase el documento Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990).
- 15 Se introduce un vector de ADN en una procarionta o células mediante técnicas de transformación o transfección convencionales. Los métodos adecuados para la transformación o transfección de células huésped se pueden encontrar en el documento de Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory press (2001)), y otros manuales de laboratorio.
- 20 La siembra de las células en la matriz o armazón se pueden llevar a cabo de acuerdo con métodos convencionales. Por ejemplo, se ha publicado la siembra de células en sustratos poliméricos para su uso en reparación tisular (véase, por ejemplo, los documentos de Atala, A. et al, J. Urol. 148(2 Pt 2): 658-62 (1992); Atala, A., et al. J. Urol. 150 (2 Pt 2): 608-12 (1993)). Las células cultivadas en un cultivo se pueden tripsinizar para separar las células, y las células separadas se pueden sembrar en la matriz. De manera alternativa, las células obtenidas del cultivo celular se pueden elevar de la placa de cultivo como una capa celular, y la capa celular sembrarse directamente en el armazón sin una separación previa de las células.
- 25 En una realización preferida, se suspenden un intervalo de 1 millón a 700 50 millones de células en un medio y se aplican a cada centímetro cuadrado de la superficie de un armazón. Preferentemente entre 1 millón y 50 millones de células, y más preferentemente, entre 1 millón y 10 millones de células se suspenden en el medio y se aplican a cada centímetro cuadrado de la superficie de un armazón. La matriz o armazón se incuban en condiciones de cultivo convencionales, tales como, por ejemplo, a 37 °C, con un 5% de CO<sub>2</sub>, durante un periodo de tiempo hasta que las células se unen. Sin embargo, se apreciará que la densidad de las células sembradas en el armazón puede variar.
- 30 Por ejemplo, las densidades celulares mayores promueven mayor regeneración tisular mediante las células sembradas, mientras que las densidades menores pueden permitir una regeneración relativamente mayor del tejido por las células del huésped que se infiltran en el injerto. Se pueden utilizar otras técnicas de siembra dependiendo de la matriz o armazón y de las células. Por ejemplo, las células se pueden aplicar a la matriz o armazón mediante filtración al vacío. La selección de los tipos celulares, y la siembra de células en un armazón, será rutinaria para un experto en la técnica a la luz de las enseñanzas del presente documento.
- 35 En una realización, el armazón se siembra con una población de células para formar una construcción de órgano artificial. En otra realización, la matriz o armazón se siembra por dos lados con dos diferentes poblaciones de células. Esto se puede llevar a cabo sembrando un lado de la matriz o armazón y luego sembrando el otro lado. Por ejemplo, el armazón se puede colocar con un lado hacia arriba y sembrarse. Luego la matriz o armazón se reposiciona de manera que un segundo lado está en la parte de arriba. El segundo lado se puede entonces sembrar con una segunda población de células. De manera alternativa, ambos lados de la matriz o armazón se pueden sembrar al mismo tiempo. Por ejemplo, se pueden posicionar dos cámaras células sobre ambos lados (es decir, en sándwich) del armazón. Las dos cámaras se pueden cargar con diferentes poblaciones celulares para sembrar ambos lados de la matriz o armazón simultáneamente. El armazón en sándwich se puede rotar o voltear con frecuencia para permitir una oportunidad de unión igual para ambas poblaciones. La siembra simultánea puede ser preferida cuando los poros de la matriz o armazón son lo suficientemente grandes para el paso de un lado al otro lado. La siembra del armazón en ambos lados simultáneamente puede reducir la probabilidad de que las células migren al lado opuesto.
- 40 En otra realización se pueden sembrar dos armazones diferentes con diferentes poblaciones celulares. Después de la siembra, las dos matrices se pueden unir juntas para formar una única matriz o armazón con dos poblaciones celulares diferentes en los dos lados. La unión de los armazones entre ellos se puede llevar a cabo utilizando procedimientos convencionales tales como pegamiento de fibrina, copolímeros líquidos, suturas y similares.
- 45 Con el fin de facilitar el crecimiento celular en el armazón de la presente invención, se puede revestir el armazón con uno o más agentes potenciadores de la adhesión celular. Estos agentes incluyen, pero no se limitan a colágeno, laminina, y fibronectina. El armazón puede contener también células cultivadas en el armazón para formar un sustituto del tejido diana. El tejido diana que se puede formar utilizando un armazón de la presente invención puede ser un vaso sanguíneo arterial, en el que se dispone una matriz de microfibras para imitar la configuración de la elastina en la capa media de un vaso sanguíneo arterial. De manera alternativa, se pueden cultivar otras células en el armazón de la presente invención. Estas células incluyen, pero no se limitan a, células cultivadas en el armazón para formar un
- 50
- 55
- 60
- 65

5 sustituto de vaso sanguíneo, células epiteliales cultivadas en el almacén para formar un tejido epitelial, células musculares cultivadas en el almacén para formar un tejido muscular, células endoteliales cultivadas en el almacén para formar un tejido endotelial, células musculares esqueléticas cultivadas en el almacén para formar un tejido muscular esquelético, células musculares cardíacas cultivadas en el almacén para formar un tejido muscular cardíaco, fibras de colágeno cultivadas en el almacén para formar un cartílago, células valvulares intersticiales cultivadas en el almacén para formar un tejido valvular y mezclas de los mismos.

#### Terapias

10 Los estudios *in vivo* presentados en el presente documento demuestran la incorporación de SAM a un hidrogel reticulado por UV bioimprimible. A modo de ejemplo no limitante, se incorporó una SAM dentro de un hidrogel basado en ácido hialurónico (HA) que, en ciertos casos se bioimprime sobre las heridas y se fotorreticula en el sitio. En consecuencia, la presente invención proporciona medios para promover la cicatrización de heridas y la regeneración tisular. En una realización, esto comprende la administración de la composición que contiene la membrana amniótica de la invención en una herida o sitio de tratamiento de un sujeto.

20 En una realización, la etapa de fotoreticulado se puede llevar a cabo bajo radiación electromagnética, por ejemplo, en las regiones visible, ultravioleta (UV), cerca de infrarrojos, infrarrojos, y/o microondas. El fotoreticulado también se puede llevar a cabo utilizando rayos gamma, rayos X, u ondas de radio según sea apropiado.

En algunas realizaciones, el fotorreticulado se lleva a cabo en presencia de fotoiniciador. El fotorreticulado también se puede llevar a cabo utilizando un reticulador, por ejemplo, un reticulador de UV.

25 En algunas realizaciones, el método de la invención se utiliza para reticular una SAM junto con un hidrogel basado en ácido hialurónico (HA), formando de esta manera un hidrogel de SAM. El hidrogel puede tener una estructura, por ejemplo, que incluya una o más micropelículas finas, una micro almohadilla, una microfibra delgada, una nanosfera o una microesfera. En algunas realizaciones, las estructuras se fabrican mediante emulsificación, fotolitografía, síntesis microfluídica, micromoldeado, o micro-electrohilado, o una combinación de los mismos. El método se puede utilizar también para revestir con el hidrogel la superficie de un sustrato.

30 En algunas realizaciones, el fotorreticulado se lleva a cabo exponiendo la SAM con un hidrogel a una fuente apropiada de radiación electromagnética, por ejemplo, una fuente de luz ultravioleta (UV) o visible, longitudes de onda cercanas a infrarrojos, infrarrojos, y microondas. En algunas realizaciones, se utilizan rayos gamma, rayos X, ondas de radio. Se puede utilizar una variedad de bombillas, láseres o fibras para proporcionar la iluminación. En algunas realizaciones, se utilizan diodos emisores de luz (LED). Son posibles diferentes longitudes de onda. En algunas realizaciones se utilizan diferentes fuentes de luz para formar una matriz de hidrogel. Cualquiera de dichas combinaciones de grupos fotorreactivos y fuentes de luz útiles para la creación de hidrogeles basados en membrana amniótica de la presente invención están dentro del alcance de la invención.

40 La composición de hidrogel reticulado de la invención se puede reticular fuera del cuerpo y luego implantarlo en un paciente, o se puede permitir que el hidrogel se reticule *in situ*.

45 En una aplicación, la invención proporciona medios para la promoción del cierre de una herida en un paciente utilizando la composición de la invención. En una realización, la invención es útil para el cuidado clínico y personal de heridas y la regeneración de tejidos blandos. De acuerdo con lo anterior, la composición que contiene membrana amniótica se transfiere a la vecindad de una herida. Esto promueve el cierre de heridas tanto externas (por ejemplo, en la superficie) como internas. Las heridas para las cuales el presente método inventivo es útil en la promoción del cierre incluyen, pero no se limitan a, abrasiones, avulsiones, heridas perforantes torácicas, falsas heridas, contusiones, heridas por arma de fuego; heridas incisas, heridas abiertas, heridas penetrantes, heridas perforantes, heridas punzantes, heridas de setón, heridas por apuñalamiento, heridas quirúrgicas, heridas subcutáneas, heridas tangenciales. El medio no necesita conseguir el cierre o cicatrización completa de la herida, es suficiente que sirva para promover cualquier grado de cierre de la herida. A este respecto, el medio puede emplearse solo o adjunto con otros métodos para la cicatrización del tejido herido.

55 En una realización, la composición que comprende la membrana amniótica en polvo o SAM se aplica directamente en una herida o sitio de tratamiento en un sujeto. Como se ha descrito en otra parte del presente documento, la membrana amniótica en polvo o SAM se puede incorporar en una formulación farmacéutica que incluyen ungüentos tópicos, cremas, pulverizadores en aerosol, y similares.

60 En un aspecto, la invención comprende la utilización de un almacén basados en membrana amniótica, que se describe en otro sitio del presente documento, como un vendaje o injerto en la herida para las heridas cutáneas externas. En un entorno clínico, el almacén se puede utilizar para tatar heridas que resulten de traumatismos, quemaduras, úlceras, abrasiones, laceraciones, cirugía, u otro daño. Los cirujanos pueden utilizar estos almacenes para cubrir y proteger el área de la herida, para reemplazar temporalmente el tejido cutáneo perdido o dañado, y para guiar la generación de nuevo tejido y la cicatrización de la herida en el área dañada. En un entorno clínico, en algunas realizaciones, el almacén puede asegurarse al área de la herida utilizando suturas, adhesivos o vendajes de cobertura. El almacén se

puede cortar para coincidir con el tamaño de la herida o puede sobrepasar los bordes de la herida. En algunos casos, puede darse forma al armazón para que penetre en cavidades formadas por heridas profundas.

5 En una realización, el armazón basado en membrana amniótica se aplica en un estado de fluido en una herida o sitio de tratamiento. En algunos casos, el armazón se polimeriza en la herida o sitio de tratamiento. En una realización, se induce la polimerización del armazón, por ejemplo, mediante la aplicación de luz UV. Por ejemplo, en una realización, se aplica un hidrogel basado en membrana amniótica en una herida o sitio de tratamiento mientras el hidrogel está en estado de fluido. El hidrogel en fluido se puede administrar por cualquier método conocido en la técnica. En una realización, el hidrogel se administra mediante una jeringa. En otra realización, el armazón se bioimprime en la herida o sitio de tratamiento.

15 La bioimpresión ha aparecido como una herramienta flexible con potencial en una variedad de aplicaciones de ingeniería de tejidos y medicina regenerativa. La bioimpresión se puede describir como el depósito robotizado que tienen el potencial de construir órganos o tejidos (Visconti et al, 2010, Expert Opin Biol Ther, 10: 409-420). En general, la bioimpresión utiliza un dispositivo de impresión controlado por una computadora para depositar células y biomateriales con precisión en geometrías tridimensionales (3D) precisas con el fin de crear estructuras anatómicamente correctas. Estos dispositivos tienen la capacidad de imprimir células (la "bio-tinta") en forma de agregados celulares, células encapsuladas en hidrogeles, o microvehículos de células sembradas. Los polímeros que proporcionan la estructura o las capacidades de mantenimiento del espacio sirven como el "bio-papel" (Fedorovich et al, 2007, Tissue Eng, 13: 1905-1925; Mironov et al, 2003, Trends Biotechnol, 21: 157-161).

20 En algunos casos, la aplicación de una composición en fluido es beneficiosa ya que puede llenar heridas de forma irregular, y penetrar a través de heridas profundas no accesibles por los injertos o parches sólidos. En algunos casos, el hidrogel comprende un fotoiniciador o agente de curado sensible a UV que permite la polimerización casi instantánea del hidrogel al administrar luz con la longitud de onda apropiada.

25 En otro aspecto, la invención comprende la utilización de composiciones que contienen membrana amniótica para el cuidado personal y en el hogar. En una realización, la composición se aplica en un vendaje. En otra realización, el armazón basado en membrana amniótica se combina con un reverso adhesivo para crear un vendaje. Una sección adhesiva puede mantener el armazón en su lugar sobre un área herida y puede retirarse cuando el armazón se degrade o fusione con el tejido. El armazón también se puede asegurar con un líquido o gel adhesivo.

30 En otro aspecto de la invención, se pueden utilizar los armazones como una gasa para absorber fluidos y proteger grandes heridas. Este armazón de gasa puede envolverse alrededor del área herida o asegurarse con un esparadrapo.

35 En otro aspecto, el método de la invención se puede utilizar para tratar heridas internas de tejidos blandos tales como heridas en el saco amniótico, úlceras en el tracto gastrointestinal o membranas mucosas, daños o recesión gingival, incisiones quirúrgicas internas, o biopsias, etc. En una realización, esto comprende la sutura o adhesión de un armazón basado en membrana amniótica para rellenar o cubrir el área de tejido dañada.

40 El armazón tiene numerosas características que son útiles para la cicatrización de heridas. Primero, los biomateriales poliméricos descritos en el presente documento que incluyen nanofibras son tanto nanoporosos y transpirables. Pueden evitar que los microbios y partículas infecciosas los traspasen, pero permiten en flujo de aire y la penetración de humedad que son críticos en la cicatrización de heridas natural.

45 En algunos casos, las fibras de la presente invención son biodegradables lo que permite cubrir la herida temporalmente seguido por un crecimiento interno eventual de nuevo tejido. La elección del material para los vendajes de heridas se puede determinar para que coincidan con las características del tejido natural incluyendo la fuerza mecánica y la tasa de degradación/regeneración tisular.

50 En algunos casos, los biomateriales pueden embeberse o conjugarse con distintos factores que se pueden liberar al degradarse. Estos factores pueden incluir, pero no se limitan a, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor beta de crecimiento transformador (TGF- $\beta$ ), e inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP), que han demostrado ser beneficiosos para la cicatrización de heridas. Los factores de cicatrización de heridas adicionales tales como antibióticos, bactericidas, fungicidas, agentes que contienen plata, analgésicos, y compuestos liberadores de óxido nítrico también se pueden incorporar en los vendajes de heridas o injertos de armazón.

55 En algunos casos, los armazones para la cicatrización de heridas se pueden sembrar con células para la regeneración tisular más rápida y estructura tisular más natural. Estas células pueden incluir, pero no se limitan a fibroblastos, queratinocitos, células epiteliales, células endoteliales, células madre mesenquimáticas y/o células madre.

60 En algunas realizaciones, la arquitectura a nano-escala de los armazones imita estrechamente la de la matriz extracelular (ECM) de muchos tejidos blandos comunes. Por ejemplo, las fibras a nano-escala son estructuralmente similares a las fibrillas de colágeno que se encuentran en la piel y otros tejidos. Esta arquitectura puede evitar la formación de cicatriz proporcionando un armazón organizado para que las células migren en una herida. En este

aspecto de la invención, se prefiere el alineamiento del almacén para mantener las células alineadas y organizadas, más que permitir que se dispongan aleatoriamente como en la formación de un tejido cicatricial. Los almacenes de biomaterial alineados se pueden orientar con respecto a un eje determinado de la herida para permitir el crecimiento del tejido más rápido y el recubrimiento de la herida.

5 El alineamiento del almacén también se puede utilizar para que coincida estrechamente la arquitectura del tejido de la ECM natural. Esto puede incluir el alineamiento de las fibras en una única dirección, el alineamiento entrecruzado en direcciones ortogonales, o una arquitectura de fibras más complicada. En este caso de la invención, el almacén incluye múltiples capas de fibras con una orientación específica de las fibras en cada capa. De manera similar, cada  
10 capa de almacén individual puede contener también un factor específico o tipo celular tales como los enumerados anteriormente. Esto permite la creación de almacenes poliméricos que coinciden estrechamente con la arquitectura y composición del tejido natural. Por ejemplo, un simple vendaje o injerto de almacén de heridas puede incluir una única capa de fibras alineadas. Por otra parte, un injerto cutáneo de almacén más complejo puede incluir múltiples láminas de fibras alineadas en capas con un patrón de entrecruzamiento con fibroblastos en las capas inferiores y  
15 queratinocitos en la capa superior, así como bFGF en las capas inferiores y un agente antimicrobiano en la capa superior. Son posibles otras de dichas combinaciones, dependiendo de las necesidades específicas del paciente.

La invención también engloba aplicaciones de regeneración tisular. El objetivo de la estrategia terapéutica de regeneración tisular es suministrar altas densidades de células competentes con la reparación (o células que se  
20 pueden convertir en competentes cuando están influenciadas por el entorno local) en el sitio del defecto en un formato que optimice tanto la mecánica inicial de la herida como la producción eventual de nuevo tejido.

La composición de la invención se puede administrar a un individuo que la necesite en una amplia variedad de maneras. Los modos preferidos de administración incluyen, intravenosa, intravascular, intramuscular, subcutánea, intracerebral, intraperitoneal, inyección en tejido blando, emplazamiento quirúrgico, emplazamiento artroscópico, e  
25 inserción percutánea, por ejemplo, por inyección directa, canulación o cateterización. Los métodos más preferidos dan como resultado la administración de la composición inventiva en el sitio o sitios del defecto tisular. Cualquier administración puede ser una única aplicación de una composición de la invención o múltiples aplicaciones. Las administraciones pueden ser en un único sitio o en más de un sitio en el individuo que se va a tratar. Las  
30 administraciones múltiples pueden producirse esencialmente al mismo tiempo o separadas en el tiempo.

### Ejemplos experimentales

La invención se describe adicionalmente con detalle en referencia a los siguientes ejemplos experimentales. Estos  
35 ejemplos se proporcionan con fines solo de ilustración.

Sin una descripción adicional, se cree que un experto habituado en la técnica puede, utilizando la descripción precedente y los siguientes ejemplos ilustrativos, fabricar y utilizar los compuestos de la presente invención y fabricar los métodos reivindicados. Los siguientes ejemplos de trabajo, por lo tanto, apuntan específicamente a realizaciones  
40 preferidas de la presente invención y no se consideran limitantes de ninguna manera de la divulgación restante.

#### Ejemplo 1: hidrogel que contiene membrana amniótica solubilizada (SAM)

Los experimentos se diseñaron para crear un producto de cicatrización de heridas con una alta eficacia clínica, y  
45 preferentemente uno que no necesite un componente celular que mantenga aún la bioactividad de un tratamiento celular.

Los parches de membrana amniótica se han implementado como vendajes para heridas cutáneas durante muchos años. Sin embargo, la aplicación de parches secados por congelación o crioconservados (injertos artificiales o basados en amnios como se ha descrito anteriormente) no es óptima para muchas heridas que tienen forma irregular y/o una  
50 profundidad variable. Para afrontar este problema, se desarrolló un protocolo para la solubilización de muestras de membrana amniótica para producir una membrana amniótica solubilizada (SAM) que se puede combinar con varios materiales para el depósito sobre las heridas. La SAM es una solución libre de células, que contiene citocinas, matriz extracelular (ECM), proteínas asociadas a la ECM y otros factores que se sabe que promueven la cicatrización de  
55 heridas y modulan las respuestas inflamatorias. La diferencia clave entre SAM y otros productos es que la SAM se deriva de membrana amniótica que es completa con todas las células y la ECM presente, de manera que contiene muchos factores que se perderían después de la descelularización. Además, el uso de una solución rica en ECM tiene ventajas sobre los productos en forma de láminas/parches de membrana amniótica por su capacidad para rellenar  
60 heridas irregulares y profundas. Esta solución se puede utilizar en muchos formatos incluyendo en líquido o aerosol, aplicada directamente en una herida, utilizado para empapar vendajes/armazones antes de colocarlos o incorporarlos en geles u otras soluciones (antibióticos/analgésicos).

Los estudios *in vivo* presentados se diseñaron para la incorporación de SAM a un hidrogel reticulado por UV bioimprimible. Específicamente, la SAM se implementó junto con un hidrogel basado en ácido hialurónico (HA) que se  
65 puede bioimprimir sobre las heridas y reticularse en el sitio casi instantáneamente. Los resultados presentados en el presente documento demuestran la efectividad del uso de HA-SAM para tratar heridas en un modelo de cicatrización

de heridas murino.

Los materiales y métodos empleados en estos experimentos se describen ahora.

#### 5 Preparación de membrana amniótica solubilizada

La membrana amniótica solubilizada (SAM) se generó a partir de amnios recolectados de tejido de gestación humano a término. La placenta humana donada se recolectó y almacenó a 4 °C hasta su uso posterior. La membrana amniótica (avascular/interna) se diseccionó manualmente de la membrana coriónica (vascular/externa). Cualquier coágulo sanguíneo presente se retiró. La membrana se lavó con 500-1000 ml de solución salina estéril.

Utilizando tijeras y pinzas estériles, se cortó la membrana amniótica en trozos de aproximadamente 5 x 5 cm. Los trozos de amnios se transfirieron a un envase estéril de 500 ml y se lavó cinco veces con 100 ml de solución salina estéril. Los trozos se lavaron entonces con 500 ml de agua estéril.

Los trozos de amnios se transfirieron a tubos de 50 ml. Durante la transferencia, los trozos se arrastraron a lo largo del borde del envase de 500 ml con el fin de retirar la máxima agua posible de cada trozo. Cada tubo de 50 ml se cargó hasta un máximo de 25 ml. Los tubos de 50 ml que contenían los trozos de amnios se mantuvieron a -80 °C durante 12-24 horas.

Los tapones de los tubos de 50 ml se retiraron y se cubrieron los tubos con Parafilm. Se perforaron varios agujeros pequeños en el Parafilm. Los tubos se colocaron en un recipiente liofilizador de cristal pre-enfriado y se liofilizaron durante 48-72 horas.

Se cargó un congelador/molinillo SPEX SamplePrep 8970 con nitrógeno líquido. Los trozos de membrana amniótica liofilizada se colocaron en la cámara del congelador/molinillo. Los trozos de membrana se molieron durante 3 ciclos de 5 minutos de frío, 5 minutos de molienda. A continuación de la molienda, se añadieron 220 mg de amnios en polvo y 22 mg de pepsina en un tubo de 15 ml. El tubo se irradió entonces con gamma durante 1 hora a 1 mega rad. A continuación de la radiación gamma, se llevaron a cabo todas las etapas posteriores en condiciones estériles. Se añadieron diez mililitros de HCl 0,01 N esterilizado al tubo. Los materiales del tubo se mezclaron entonces, permitiendo que se digirieran durante 48 horas a 37 °C.

El digerido se centrifugó a 4500 RPM durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y se colocó en otro tubo de 15 ml. La solución se neutralizó con NaOH hasta un pH de 7. La solución se almacenó en alícuotas a -80 °C hasta su uso posterior.

#### Preparación de la membrana amniótica en polvo

Para los tratamientos que utilizan membrana amniótica en polvo, se generó el polvo como se ha descrito anteriormente para la preparación de SAM. Sin embargo, a continuación de la radiación gamma, no se añade pepsina, y no se llevan a cabo las etapas de procesamiento posterior. La solución se almacenó en alícuotas a -80 °C hasta su uso posterior.

#### Preparación del hidrogel

La Figura 1B proporciona un diagrama que demuestra la química por la que el hidrogel de la invención se forma utilizando una química de fotopolimerización de tioleno. En resumen, el ácido hialurónico (HA) y la gelatina se tiolan y entonces se reticulan con PEGDA en presencia del fotoiniciador 4-(2-hidroxietoxi)fenil-(2-hidroxi-2-propil)cetona utilizando la radiación con luz UV. Se incorporó una solución SAM en la solución de hidrogel de HA con una relación 1:1 antes de la reticulación con UV. Para la bioimpresión, se prepararon las soluciones como se ha descrito anteriormente en los tubos y se cargaron en la impresora. En el caso de hidrogeles fotorreticulables, todos los componentes se mezclaron juntos en un tubo. El dispositivo consiste en un carro con capacidad de movimiento en 3 ejes en el que se alberga la cabeza impresora principal. La cabeza impresora se compone de un conjunto de boquillas que dirigen la presión a través de las cuales se imprimen las soluciones de hidrogel, y un conjunto de boquillas de alta presión para las soluciones secundarias, si fuera necesario, tal como los reticuladores que se van a imprimir. Las soluciones de hidrogel se albergan en cartuchos intercambiables en línea con la presión posterior y las cabezas de impresión. El proceso de impresión se controla utilizando una plataforma de software que utiliza un escáner para medir el tamaño y profundidad de la herida, y controla la posición de las boquillas y el flujo de la solución para imprimir los volúmenes óptimos de solución dentro del sitio de la herida.

#### 60 Ensayos *in vitro*

La viabilidad de los queratinocitos y fibroblastos se determinó después de la encapsulación en el HA-SAM y la exposición a la luz UV durante 30 s para iniciar la reticulación. Se utilizó un ensayo VIVAS/MUERTAS para medir la relación de células vivas/muertas. Se utilizó un ensayo MTS para medir el efecto de la SAM sobre la proliferación de queratinocitos y fibroblastos *in vitro*. Se lleva a cabo una matriz proteómica para medir los niveles de citocinas implicadas en la proliferación, migración celular y neovascularización.

Modelo de heridas cutáneas

5 Se crearon heridas de 2,0 x 2,0 cm de espesor completo en la piel dorsal de ratones atímicos. Se depositaron geles de HA-SAM o HA solo y se reticularon dentro de las heridas. Los ratones de control no recibieron tratamiento salvo procedimientos de vendaje convencionales. Se midieron el tamaño de la herida, la re-epitelización, y la contracción inmediatamente después de la cirugía, y el día 4, 7, 10 y 14 después de lo cual los animales se sometieron a eutanasia, y se recolectó la piel regenerada para su análisis histológico.

10 En el modelo porcino, se crearon heridas de 4,0 x 4,0 cm de espesor completo en los flancos dorsales de cerdos Yorkshire libres de patógenos específicos (SPF). Se depositaron geles de HA-SAM y se reticularon dentro de las heridas. Adicionalmente, amnios esterilizado en polvo, se aplicó en las heridas, bien directamente como un polvo, o después de la resuspensión en solución salina. Las heridas de control recibían otros productos de cicatrización de heridas disponibles en el comercio GraftJacket® o Amniograft®, así como armazones de cicatrización de heridas de electrohilado experimental. Las heridas de control no recibieron tratamiento salvo procedimientos de vendaje convencionales. Se midieron el tamaño de la herida, la re-epitelización, y la contracción inmediatamente después de la cirugía, y el día 4, 7, 10, 14, 18, 21, 24 y 28 después de lo cual los animales se sometieron a eutanasia, y se recolectó la piel regenerada para su análisis histológico y bioquímico.

20 Espesor de la piel

Se llevó a cabo el examen del espesor de la piel en secciones histológicas teñidas con eosina y hematoxilina, utilizando un software de creación de imágenes para medir el espesor tanto de los componentes de la epidermis como de la dermis de los tejidos regenerados.

25

Proliferación celular *in vivo*

La proliferación celular *in vivo* se midió llevando a cabo una tinción inmunohistoquímica para el marcador de proliferación Ki-67 junto con un marcador de la epidermis, Keratin 10. Las células en proliferación marcadas con los anticuerpos Ki-67, y los anticuerpos Keratin 10 proporcionaban la información de localización para la epidermis.

30

Expansión del hidrogel

35 Los experimentos de expansión del hidrogel se llevaron a cabo añadiendo 3 ml de solución salina a 0,5 ml de hidrogeles reticulados y midiendo el peso de los hidrogeles cada 6 horas durante un periodo de 24 horas. Durante cada pesaje, se retiraba cuidadosamente el tampón de superficie con el fin de pesar solamente la expansión de la red de hidrogel. Los viales en los que los geles estaban contenidos se pesaron antes del experimento, y los pesos se restaron de los últimos pesos de vial-gel para dar los pesos del gel solo para los análisis.

40 Liberación de proteínas

Se midió la liberación de proteínas añadiendo 0,1 ml de solución salina a las alícuotas de 0,1 ml de hidrogeles reticulados, incubando durante 24 horas, y retirando la solución salina para los análisis. Se midió la concentración total de proteínas en la solución salina mediante un ensayo colorimétrico y una curva de referencia de la proteína. A continuación de la medición, se reemplazó el volumen de solución salina con solución salina nueva y se repitió el procedimiento. Esto se continuó durante un periodo de 14 días.

45

Los resultados de los experimentos se describen ahora.

50 Composiciones de membrana amniótica para la cicatrización de heridas

En los experimentos presentados en el presente documento se utilizaron de manera intercambiable hidrogeles HA-SAM y gel de HA + amnios. Se evaluaron los queratinocitos y fibroblastos primarios en cuanto a su capacidad para sobrevivir dentro del hidrogel de HA-SAM. Se observó que la viabilidad de los queratinocitos primarios (Figura 2A) y los fibroblastos (Figura 2B) era alta después de la resuspensión en el hidrogel de HA-SAM y reticulado con UV. Las células se mantenían de un 92-98 % viables después de la encapsulación en el gel.

55

Se llevó a cabo un estudio de cicatrización de heridas para evaluar la eficacia del hidrogel HA-SAM. Se creó una herida de 2 cm por 2 cm de espesor completo en el lomo de ratones atímicos. Cada ratón herido recibió una de las tres opciones de tratamiento; (1) sin tratar excepto un vendaje convencional, (2) Solo gel HA, o (3) gel HA-SAM. En la Figura 3 se representa las imágenes del curso de las heridas. La morfología macroscópica de las heridas demuestra tiempos de cicatrización de heridas acelerada y contracción reducida en los grupos de HA-SAM. Se calculó el porcentaje (%) de herida remanente dividiendo el área de la herida remanente por el tamaño original de la herida. Los grupos con HA-SAM tenía una aceleración significativa de los tiempos de cierre de la herida resultando en un cierre de la herida 3-4 días antes de los otros grupos (Figura 4A). La re-epitelización de la herida se calculó midiendo de nuevo la piel re-epitelizada, teniendo en consideración el área de la herida remanente y la contracción. Los grupos de

65

HA-SAM tenían una re-epitelización de la herida significativamente mayor en todos los momentos en comparación con otros grupos (Figura 4B). Se midió la contracción basándose en el tamaño original de la herida y el área de piel re-epitelizada. Los grupos de solo gel HA y HA-SAM tenían significativamente menos contracción en comparación con los animales sin tratar (Figura 4C). La relación de aspecto de la herida se determinó para describir los cambios observados en la forma y dirección de la contracción de la herida entre los grupos. Los grupos de gel solo con HA y HA-SAM presentaban una contracción simétrica con relaciones de aspecto cercanos a 1 mientras que los otros grupos presentaban una contracción asimétrica con relaciones de aspecto más cercanos a 4 (Figura 4D). En el estudio porcino, los grupos de HA-SAM y tratados con amnios en polvo presentaban una cicatrización, re-epitelización de la herida acelerada, y una reducción de la contracción en comparación con los no tratados disponibles en el mercado, y los grupos experimentales (Figura 7).

Las secciones de área de heridas se sometieron a tinción con hematoxilina y eosina (H/E) para detectar los vasos sanguíneos dentro del tejido. Como se muestra en la Figura 5, había significativamente más vasos sanguíneos en el animal tratado con HA-SAM en comparación con el gel solo con HA y los grupos sin tratar. La densidad de vasos sanguíneos dentro de las áreas de piel regenerada se cuantificó llevando a cabo el recuento en 6 campos representativos de vista (Figura 5D), que demostraban un aumento de densidad en los animales tratados con HA-SAM en comparación con los grupos sin tratar y con gel solo con HA. El área del vaso sanguíneo se calculó y se representa como el tamaño relativo del vaso sanguíneo dentro de la piel sana del mismo ratón (Figura 5E). El tamaño medio del vaso sanguíneo era significativamente menor en el animal tratado con HA-SAM en comparación con los grupos del gel solo con HA y sin tratar. Se determinó la distribución de los vasos sanguíneos entre los vasos grandes, medios y pequeños, que demostró que la piel tratada con HA-SAM tenía un número similar de vasos grandes y medianos, pero significativamente más vasos sanguíneos menores, sugiriendo la formación de nuevos vasos sanguíneos (Figura 5F).

Los vasos sanguíneos en la piel regenerada se sometieron a tinción inmunofluorescente para la actina- $\alpha$  de músculo liso ( $\alpha$ SMA) y factor de von Willebrand (vWF). Se observó que las muestras de HA-SAM tenían significativamente más vasos sanguíneos que los otros grupos y estos vasos sanguíneos parecían de tamaño menor que los vasos dentro de la piel de los otros grupos (Figura 6A-C). La epidermis de los animales se sometió a tinción inmunofluorescente para keratin 10 para detectar la epidermis y Ki-67 para detectar las células en proliferación (Figura 6D-F). Se identificaron significativamente más células en proliferación cerca de la epidermis de los animales tratados con HA-SAM en comparación con los grupos tratados con gel solo de HA y sin tratar (flechas). En los grupos sin tratar las células en proliferación también se identificaron dentro de la dermis mientras que era raro en los grupos con gel solo de HA y HA-SAM.

El espesor de la piel y la proliferación celular también se examinaron en los animales tratados con HA y tratados con HA-SAM, en comparación con la piel sin tratar. Se observó que el espesor total de la piel era mayor en los animales tratados con HA y tratados con HA-SAM en comparación con la piel sin tratar (Figura 8A). Adicionalmente, se contó un número mayor de células en proliferación positivas a Ki67 en la piel tratada con HA-SAM que en la piel tratada con HA y sin tratar (Figura 8B).

Se comparó la expansión del hidrogel entre el hidrogel de HA y los hidrogeles de HA-SAM. No se midió una expansión significativa para el hidrogel de HA o el hidrogel HA-SAM sumergido en solución salina (Figura 9A). Esto sugiere que los hidrogeles no absorberán o liberarán cantidades significativas de líquido una vez que se aplican en una herida.

Se llevaron a cabo experimentos para evaluar la liberación de proteínas del hidrogel. Se observó liberación de proteínas del hidrogel de HA-SAM durante un periodo de tiempo de 14 días demostrando la liberación controlada y extendida de factores a lo largo del tiempo (Figura 9B). Los modelos cinéticos de la liberación de proteínas se ajustaron a la liberación de proteínas acumulada observada para investigar el mecanismo de liberación proteica. Los modelos de cinética de liberación ajustados a la liberación de proteínas acumulada indican que la liberación está dominada primariamente por las cinéticas de difusión a través de una matriz física compleja (Figura 9C a Figura 9E). El modelo de liberación de primer orden que analiza la liberación de proteínas dependiente de la concentración tiene un valor bajo de  $R^2$  (Figura 9C), El modelo de Hixson-Crowell que analiza la liberación de proteínas debido a la degradación del hidrogel muestra un valor aumentado, pero aún bajo de  $R^2$  (Figura 9D). El modelo de liberación de Higuchi que analiza la liberación de proteínas debido a la difusión tiene un aumento del valor  $R^2$ , indicando un ajuste mecánico mejor (Figura 9E).

Las heridas sin tratar (de control) o tratadas con hidrogeles con HA o hidrogeles con HA-SAM se sometieron a tinción histoquímica con distintas tinciones (Figura 10). La tinción de colágeno de Herovici, tricrómica de Masson y tinción con Rojo picrosirio sugerían que la piel tratada con HA y tratadas con HA-SAM tenían tipos de colágeno modificado, madurez y distribución en comparación con la piel sin tratar, sugiriendo una cicatriz reducida y maduración de la piel. El azul Alciano y tinción de Verhoeff van Geison también revelaba las diferencias en una composición de elastina, proteoglicanos, y glicosaminoglicanos entre los grupos.

Colectivamente, los datos presentados en el presente documento demuestran que los hidrogeles de HA-SAM tratan eficazmente las heridas. Los queratinocitos y fibroblastos que se encapsularon en el gel mantenían por encima del 95 % de viabilidad después del reticulado. Los estudios *in vitro* demostraban que la SAM aumentaba la proliferación y migración de queratinocitos y fibroblastos primarios. En el modelo de heridas de ratón, la re-epitelización se producía



5 con velocidades más rápidas en los ratones tratados con HA-SAM, dando como resultado una cicatrización de la herida significativamente más rápida en comparación con los otros grupos. Además, las heridas tratadas con HA-SAM y solo con HA presentaban una disminución de la contracción de la herida con una relación de aspecto cercana a 1,0 en comparación con las heridas de control que se contraían más linealmente con relaciones de aspecto de entre 3,0 y 4,0. La histología revelaba que la piel regenerada tratada con HA-SAM contenía una densidad de vasos sanguíneos significativamente más alta y un número mayor de queratinocitos en proliferación dentro de la capa de epidermis. Los datos presentados en el presente documento demuestran que los hidrogeles de HA-SAM son un tratamiento libre de células eficaz para las heridas cutáneas.

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición que comprende membrana amniótica y un armazón de hidrogel que comprende un biopolímero y un polímero sintético para su uso en un método de inducción de la cicatrización de heridas y la regeneración tisular en un sujeto, donde la composición es para administrarse en un sitio de tratamiento del sujeto,
- 5 donde el biopolímero se selecciona de entre el grupo que consiste en hialuronano y gelatina;
- 10 donde el polímero sintético se selecciona de entre el grupo que consiste en (met)acrilato-oligoláctido-PEO-oligoláctido-(met)acrilato, poli(etilenglicol) (PEO), poli(propilenglicol) (PPO), copolímeros PEO-PPO-PEO, poli(fosfazeno), poli(metacrilatos), poli(N-vinilpirrolidona), PL(G)A-PEO-PL(G)A, poli(etilenimina), y poli(etil glicol) diacrilato;
- 15 donde la membrana amniótica se prepara:
- a) cortando la membrana amniótica de un mamífero en trozos,
  - b) lavando los trozos cortados con solución salina estéril,
  - c) lavando los trozos cortados con agua estéril,
  - d) congelando los trozos cortados,
  - e) liofilizando los trozos ya congelados para formar trozos de membrana amniótica liofilizada,
  - f) moliendo los trozos de membrana amniótica liofilizada para formar una membrana amniótica en polvo, y
- 20 opcionalmente formando la membrana amniótica solubilizada (SAM) co-incubando la membrana amniótica en polvo con pepsina en una solución, centrifugando el digerido y retirando el sobrenadante como SAM,
- 25 donde la membrana amniótica se incorpora en el armazón.
2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la membrana amniótica liofilizada se irradia con radiación gamma después de la formación de la membrana amniótica en polvo.
3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la solución es HCl esterilizado.
- 30 4. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la molienda se lleva a cabo en una cámara de congelador/molinillo.
5. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la composición comprende
- 35 (a) membrana amniótica en polvo, o  
(b) membrana amniótica solubilizada (SAM).
6. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la composición tiene la forma de:
- 40 (a) una solución;  
(b) un ungüento; o  
(c) un pulverizador de aerosol.
7. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la membrana amniótica se deriva de una muestra de membrana amniótica obtenida de un mamífero.
- 45 8. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el armazón comprende un fotoiniciador.
9. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el al menos un biopolímero está tiolado.
- 50 10. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el armazón está bioimpreso en el sitio de tratamiento.
11. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, donde el método comprende la administración de luz UV en el sitio de tratamiento para inducir la polimerización del armazón.
- 55 12. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la composición se aplica:
- (a) directamente en el sitio de tratamiento; o
  - (b) en la superficie de un vendaje.
- 60 13. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el sitio de tratamiento es:
- (a) sobre la superficie externa de un sujeto; o
  - (b) en una localización interna dentro del sujeto.
- 65

14. Una composición farmacéutica que comprende una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13.

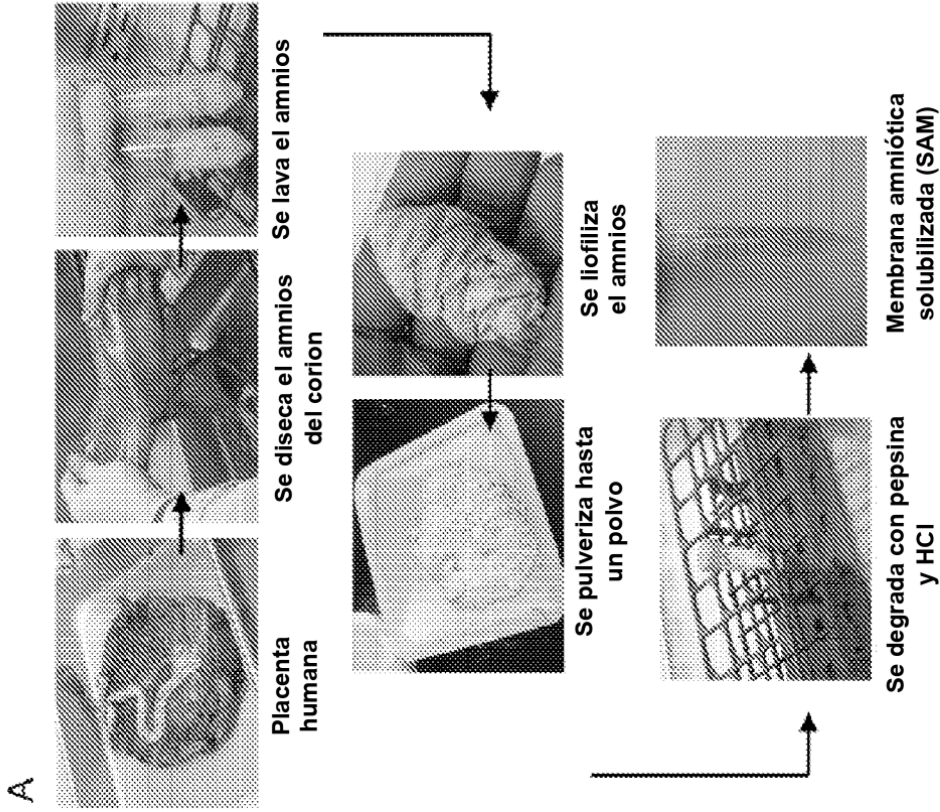


Figura 1A

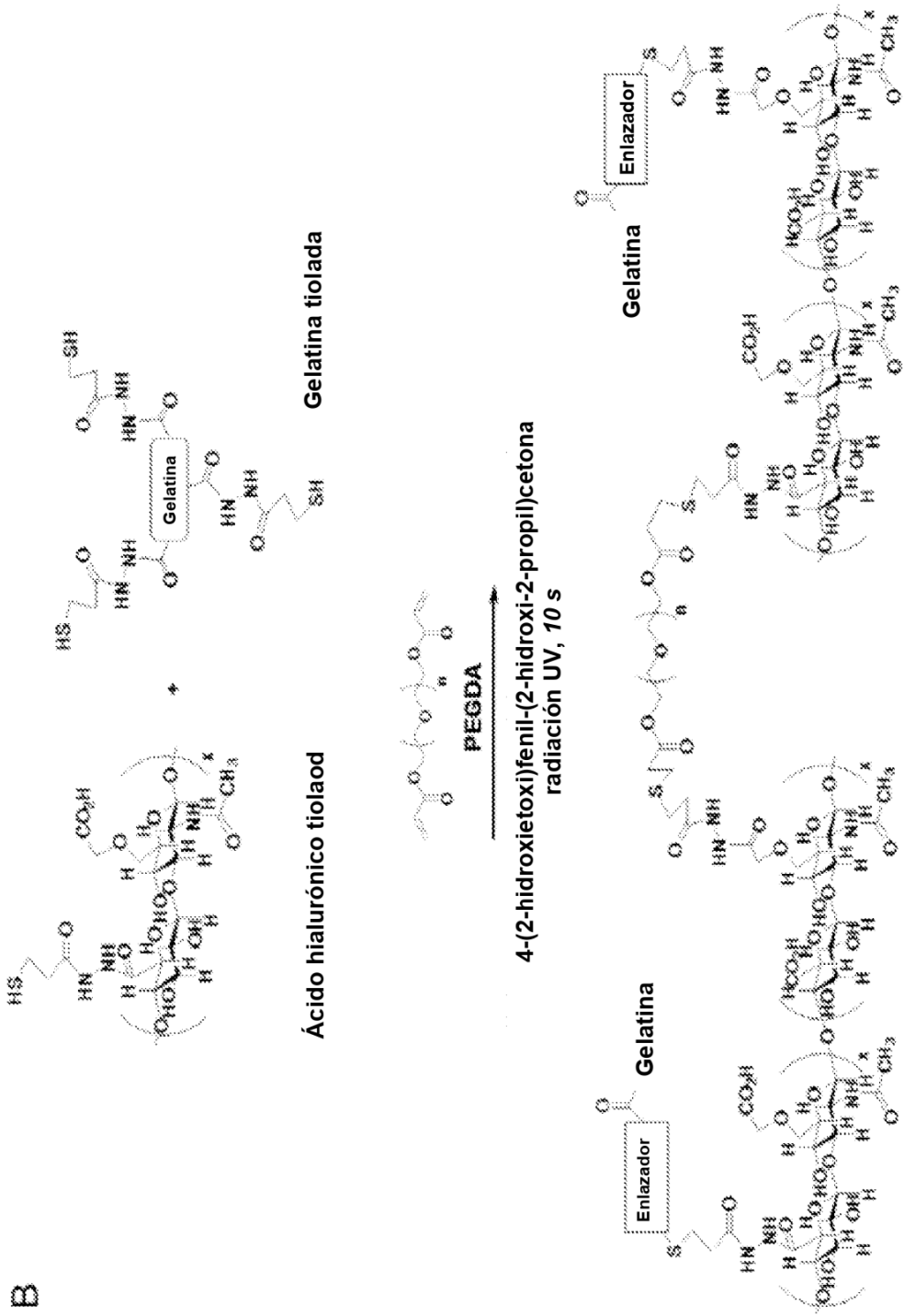


Figura 1B

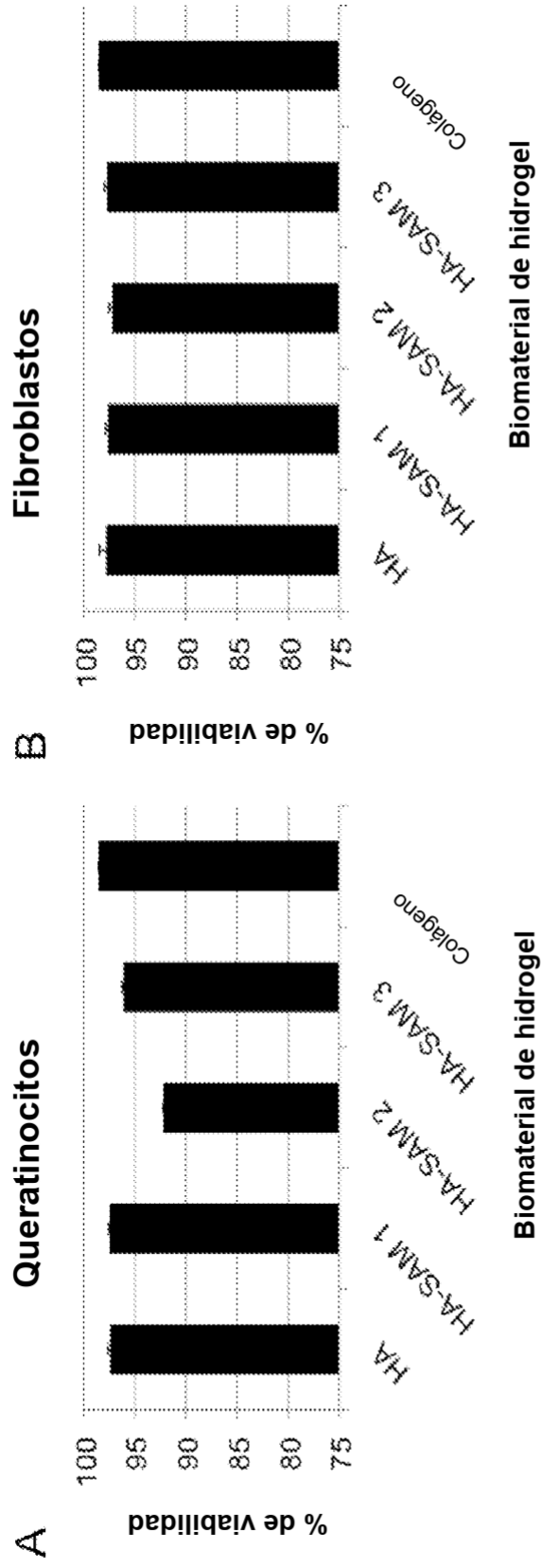


Figura 2

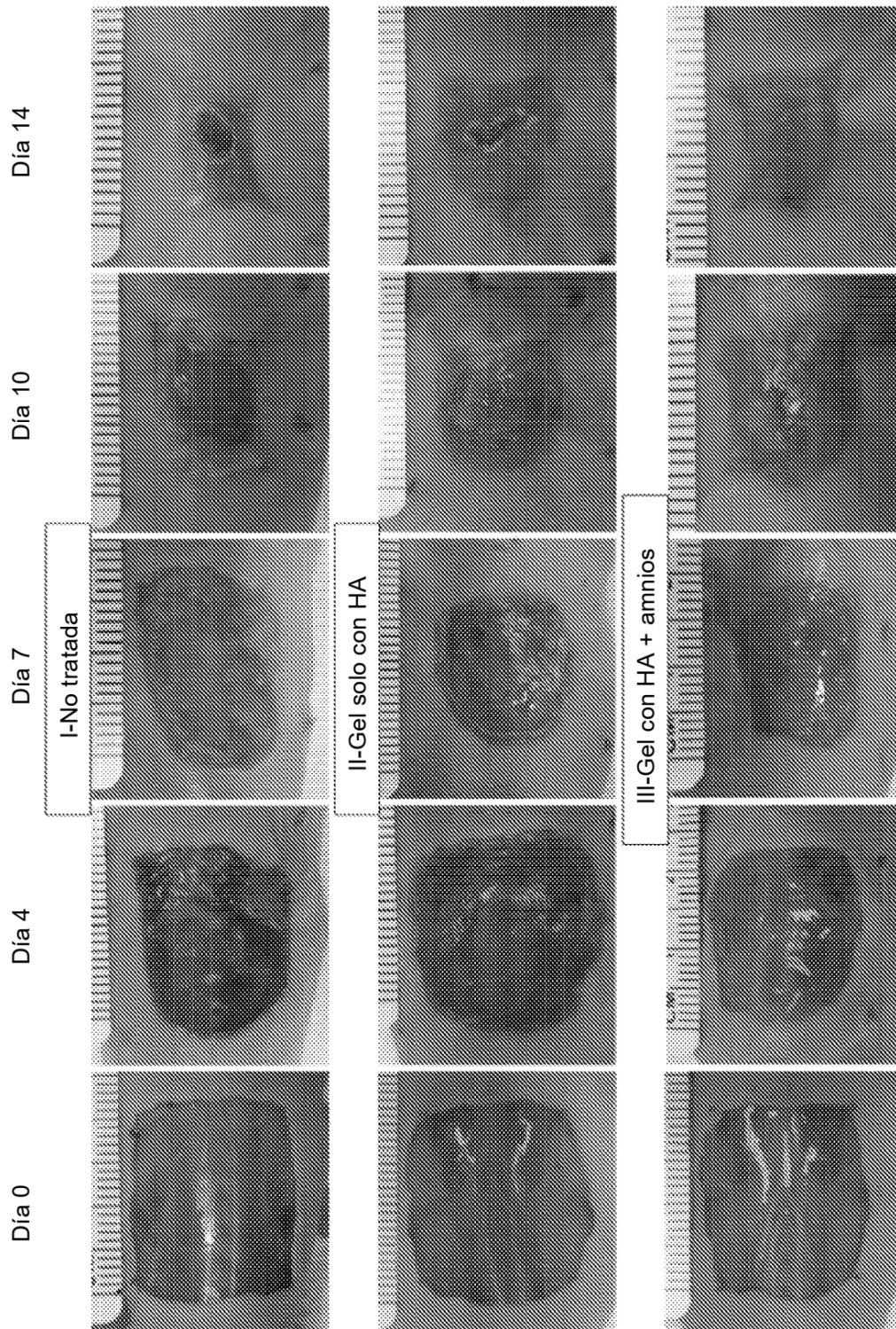


Figura 3

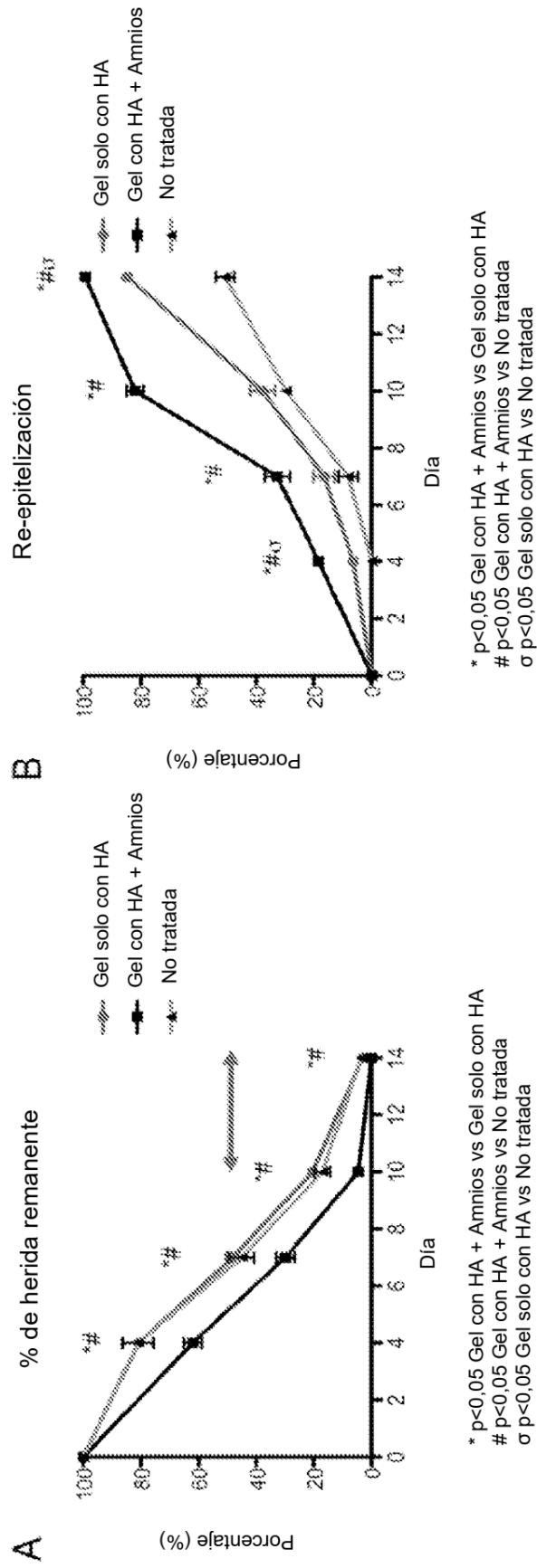


Figura 4A-4B



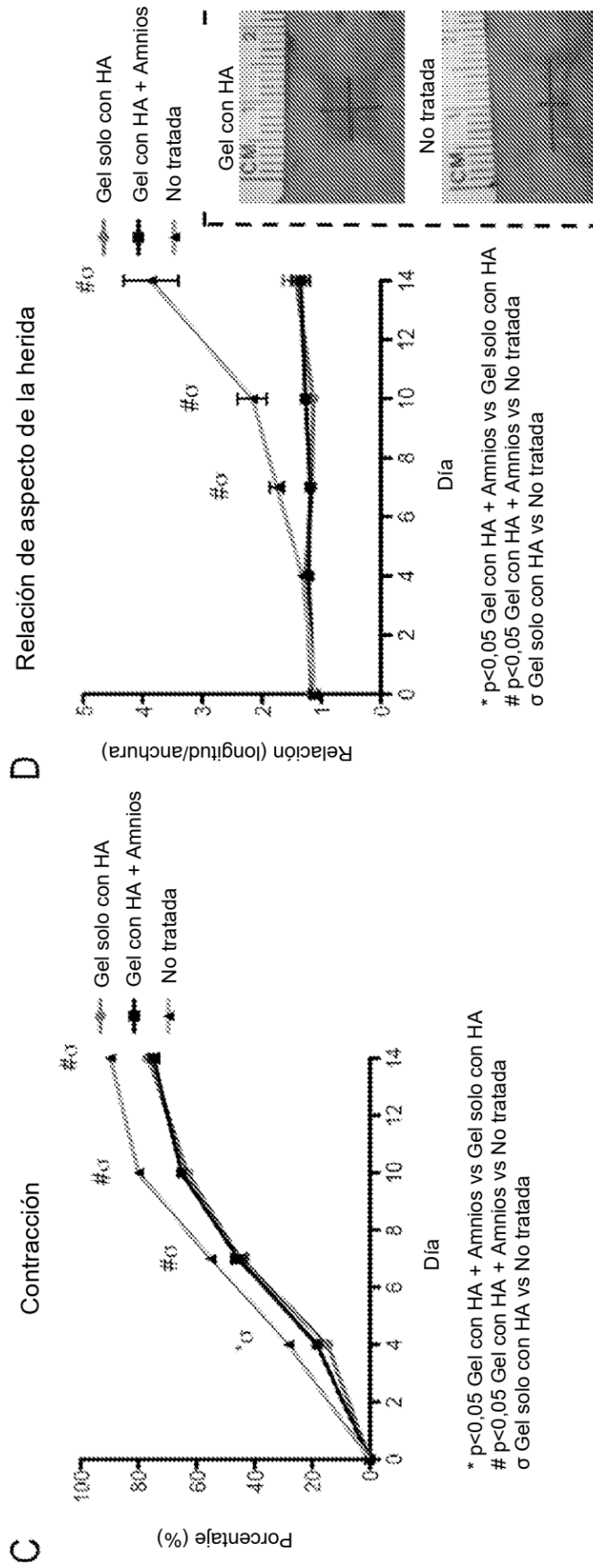


Figura 4C-4D

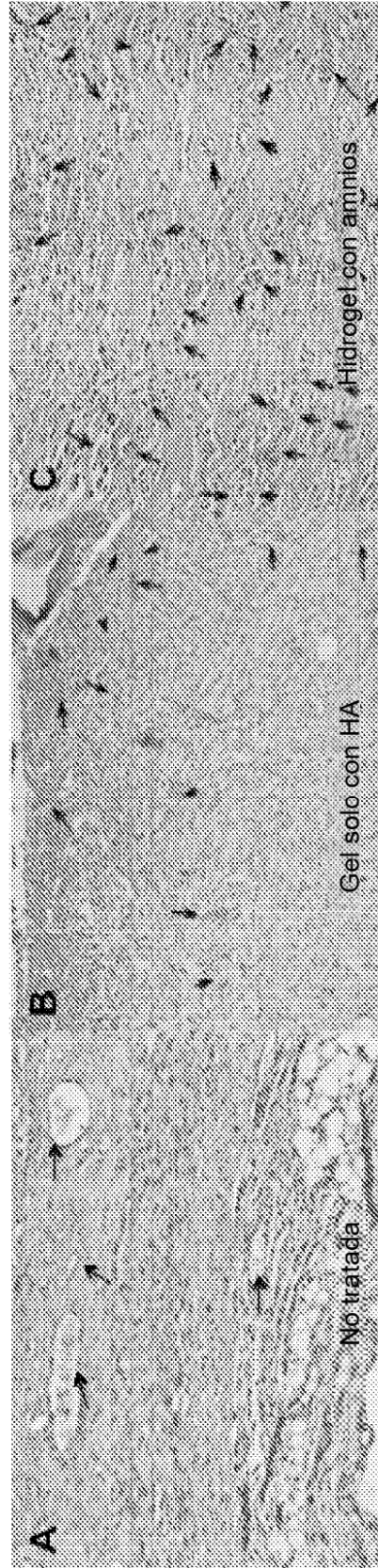


Figura 5A-5C

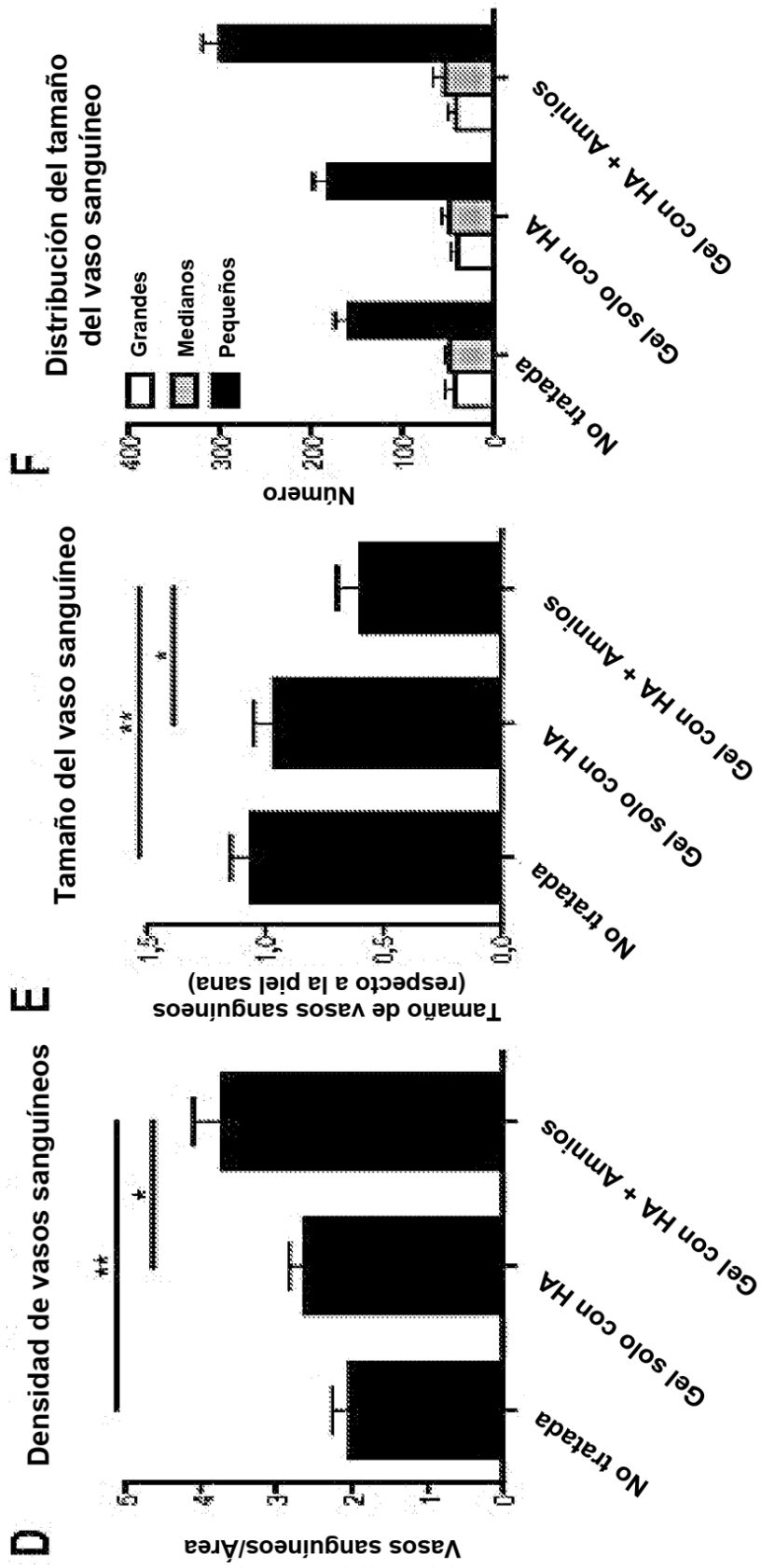


Figura 5D-5F

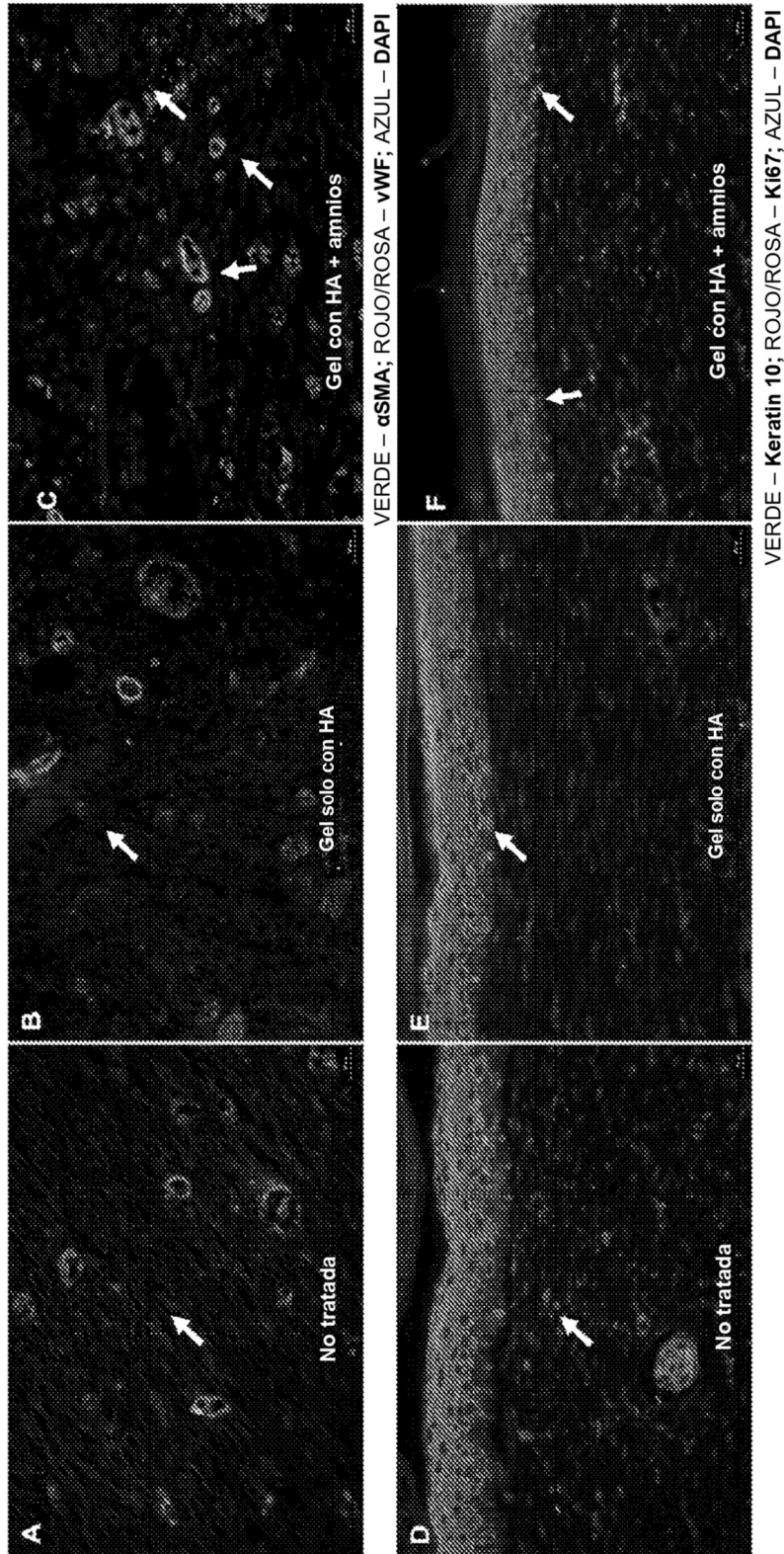


Figura 6

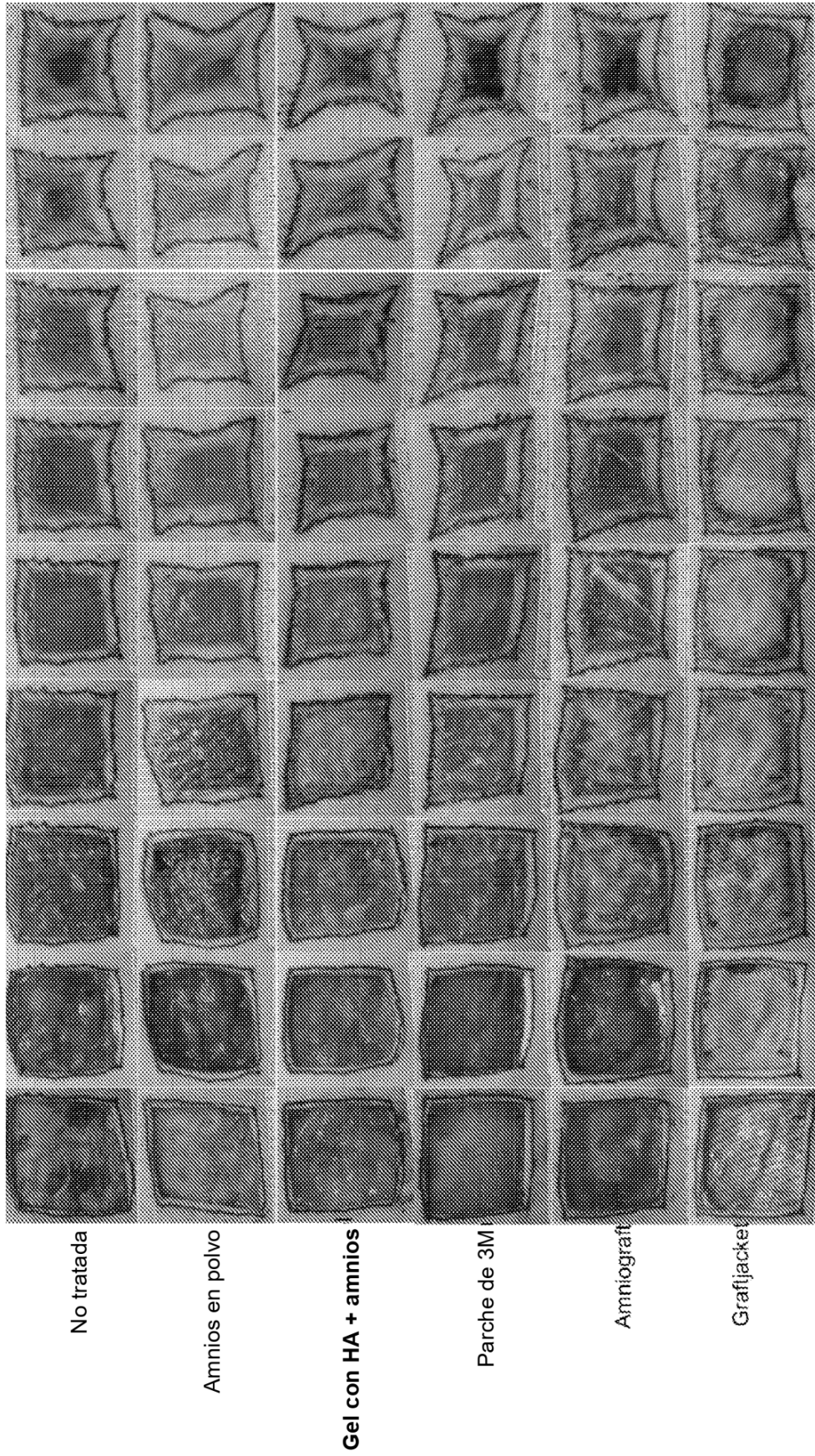


Figura 7

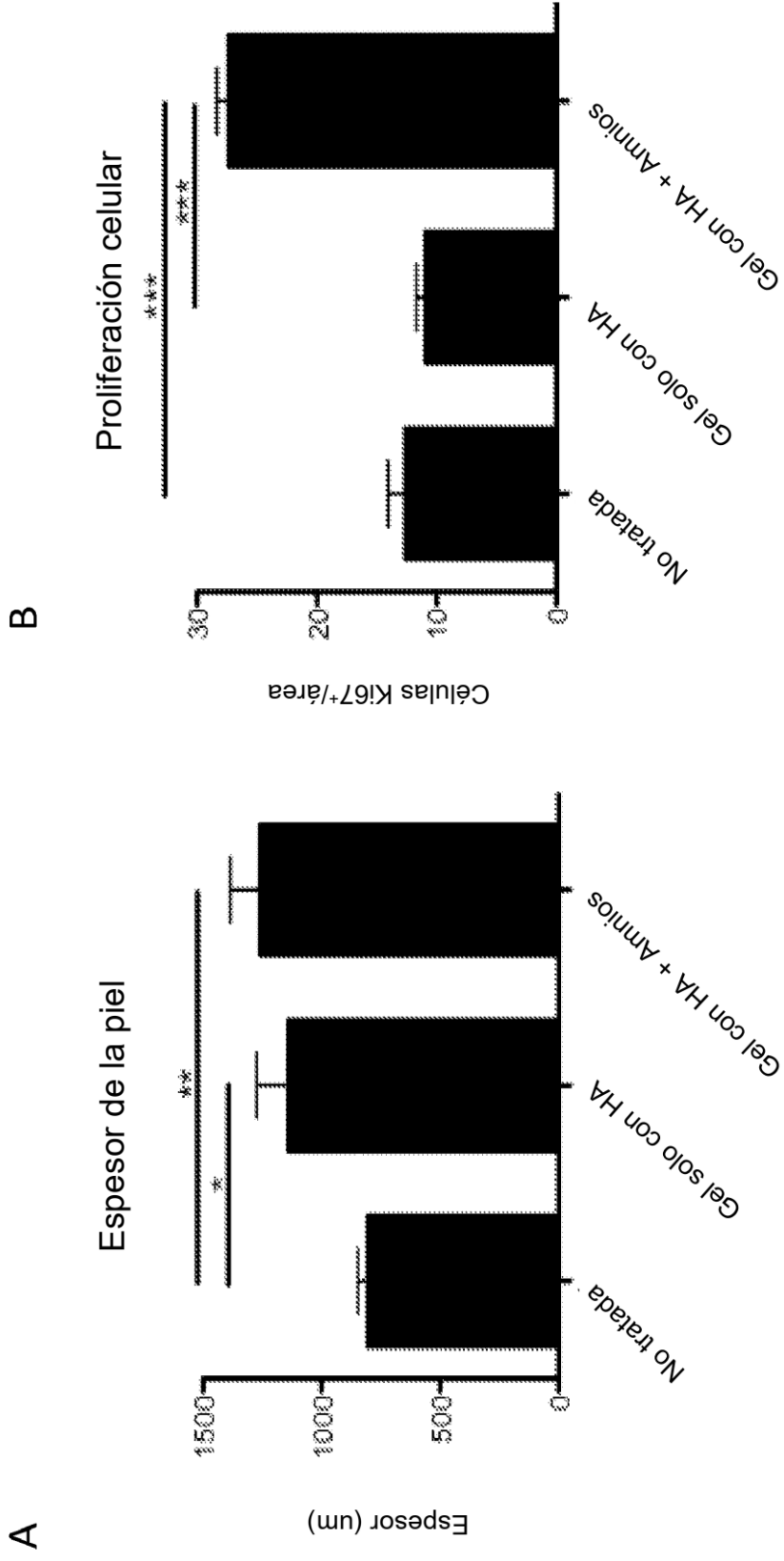


Figura 8

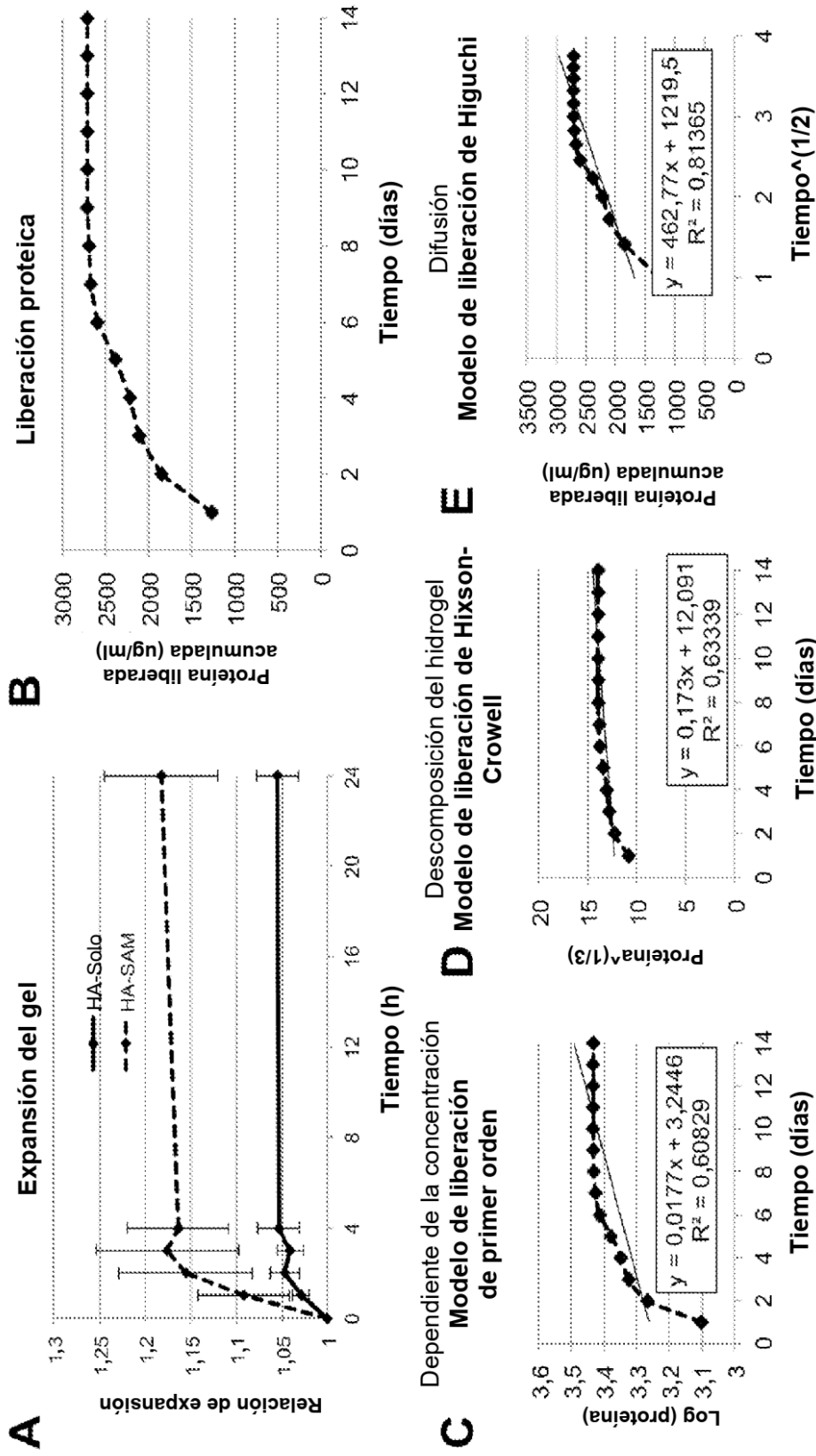
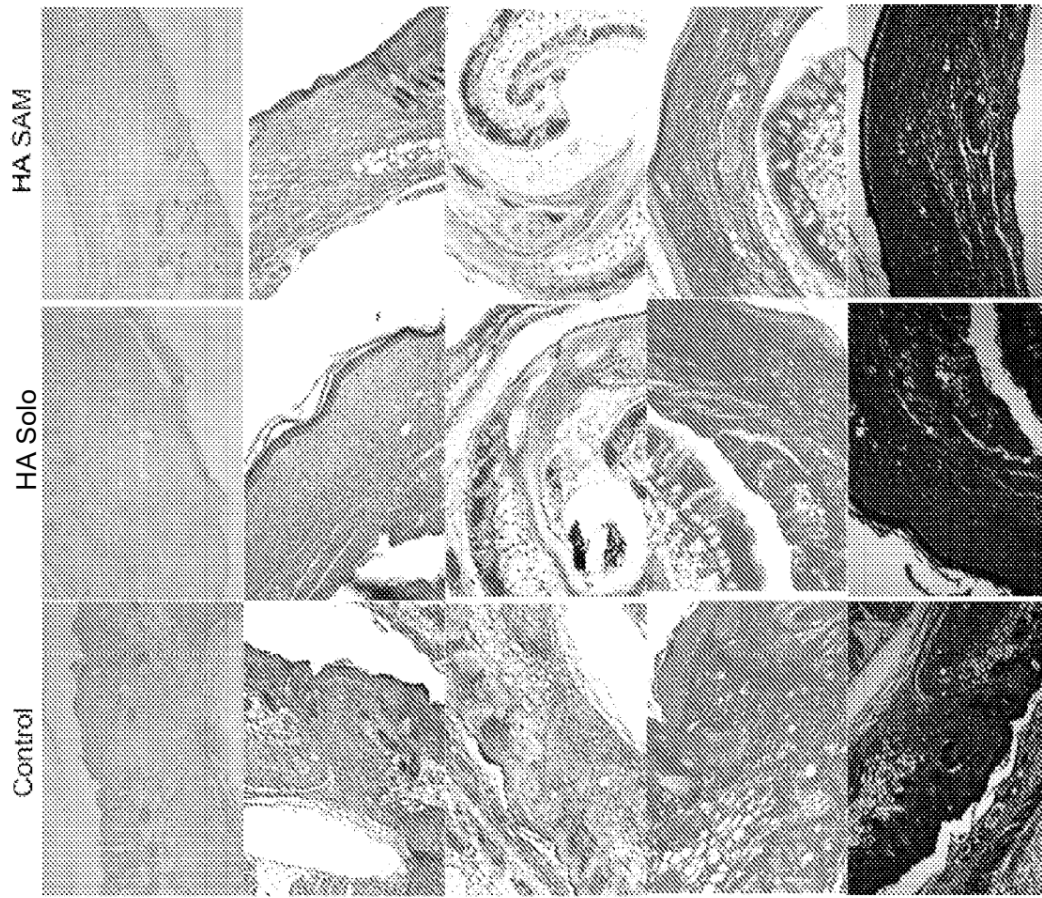


Figura 9





Azul Alciano – Proteoglicanos/  
glicosaminoglicanos en azul

Colágeno de Herovici – Colágeno  
joven, en azul;  
colágeno maduro, en rojo

Tricrómica de Masson – colágeno  
en azul

Rojo Picrosirio – Fibras  
de colágeno

Verhoeff van Geison –  
Elastina en negro

Figura 10