(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 900 336**

(51) Int. CI.:

A61L 27/36 (2006.01)
A61L 27/54 (2006.01)
A61L 27/56 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.12.2015 PCT/US2015/065436**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **30.06.2016 WO16105984**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2015 E 15848144 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.09.2021 EP 3237027**

(54) Título: **Composiciones basadas en tejido y métodos de uso de las mismas**

(30) Prioridad:

24.12.2014 US 201414582288

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.03.2022

(73) Titular/es:

FETTECH, LLC (100.0%)
12040 Ashford Lane
Davie, FL 33325, US

(72) Inventor/es:

FETTE, CLAY

(74) Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

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

Composiciones basadas en tejido y métodos de uso de las mismas

Campo técnico

La presente divulgación se refiere, en general, a composiciones que comprenden materiales de matriz extracelular (MEC).

Antecedentes

Se han usado biomateriales en una variedad de aplicaciones médicas como alternativa a, o junto con, materiales convencionales para ayudar en la curación, la reparación de tejido y otras formas de tratamiento médico. Dichos biomateriales incluyen MEC, un material estructural complejo encontrado dentro de tejidos que rodean y soportan las células. La MEC está constituida, en general, por tres clases principales de biomoléculas: proteínas estructurales, tales como colágeno y elastina; otras proteínas, tales como laminina, fibronectina, y diversos factores de crecimiento; y proteoglicanos. La MEC deriva de tejido colagenoso y se procesa para su aplicación en el sitio de la lesión corporal. Aunque los materiales de MEC se pueden usar para ciertas aplicaciones médicas, los actuales materiales de MEC dejarán frecuentemente de proporcionar integridad estructural suficiente y bioactividad. El documento de patente WO2010/099463 A2 desvela armazones de matriz extracelular (MEC) para la regeneración y la sustitución de tejido cartilaginoso. Los armazones comprenden un núcleo de MEC en partículas y/o de gel encapsulado dentro de una vaina de MEC.

Sumario

El alcance de la presente invención se define por las reivindicaciones. Cualquier "realización" o "ejemplo" que se desvela en la descripción, pero que no está cubierto por las reivindicaciones, se debe considerar como presentado solo para fin ilustrativo. La presente invención desvela una composición que comprende un primer material de matriz extracelular derivado de tejido de bazo; y un segundo material de matriz extracelular derivado de al menos un tejido de mamífero elegido de tejido de pulmón, tejido de la vesícula biliar, tejido de la médula ósea, tejido pancreático, o tejido de hígado, estando integrado el segundo material de matriz extracelular al menos parcialmente en el primer material de matriz extracelular; en donde el primer material de matriz extracelular tiene una concentración de al menos un factor de crecimiento que es superior a una concentración del al menos un crecimiento del segundo material de matriz extracelular, y el segundo material de matriz extracelular tiene una mayor concentración de elastina que el primer material extracelular, en donde al menos una porción de la composición está en forma de partículas, y en donde la composición está configurada para administración a un paciente. Las realizaciones de la presente divulgación pueden incluir una o más de las siguientes características: el primer y/o segundo material de matriz extracelular puede estar en forma de partículas; el segundo material de matriz extracelular puede derivar de tejido de pulmón; uno del primer material de matriz extracelular o el segundo material de matriz extracelular puede estar en forma de partículas, y el otro de la primera matriz extracelular y la segunda matriz extracelular puede estar en forma de gel; uno del primer material de matriz extracelular o el segundo material de matriz extracelular puede estar en forma de partículas, y el otro del primer material de matriz extracelular o el segundo material de matriz extracelular puede estar en forma de hoja; la composición se puede configurar para aplicación al tejido natural del paciente para la reparación de tejido natural; la composición puede tener una forma de tipo varilla o una forma tubular; al menos una porción del segundo material de matriz extracelular puede estar en forma de partículas, de forma que el segundo material en partículas de la matriz extracelular se pueda incorporar en el primer material de matriz extracelular, en donde el segundo material de matriz extracelular puede derivar de tejido de pulmón; la composición puede incluir al menos dos capas, en donde al menos una de las capas comprende el segundo material en partículas de la matriz extracelular integrado en el primer material de matriz extracelular; la composición puede comprender además al menos un agente antimicrobiano, tal como plata iónica; el primer material de matriz extracelular puede tener una concentración de al menos un factor de crecimiento superior a una concentración del al menos un factor de crecimiento del segundo material de matriz extracelular; y/o el al menos un factor de crecimiento se puede elegir de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) o factor de crecimiento epidérmico (EGF).

La presente divulgación incluye además una composición que comprende un primer material de matriz extracelular derivado de tejido del bazo, y un segundo material de matriz extracelular derivado de al menos un tejido de mamífero elegido de tejido de pulmón, tejido de la vesícula biliar, tejido de la médula ósea, tejido pancreático, o tejido de hígado, estando integrado el segundo material de matriz extracelular al menos parcialmente en el primer material de matriz extracelular, en donde el primer material de matriz extracelular tiene un mayor contenido de factor de crecimiento que el segundo material de matriz extracelular, y el segundo material de matriz extracelular está integrado al menos parcialmente en el primer material de matriz extracelular, en donde el primer material de matriz extracelular está en una forma diferente de una forma del segundo material de matriz extracelular, y en donde la composición está configurada para aplicación al tejido natural de un paciente para la reparación del tejido natural. Las realizaciones de la presente divulgación pueden incluir una o más de las siguientes características: uno del

primer material de matriz extracelular o el segundo material de matriz extracelular puede estar en forma de partículas, y el otro del primer material de matriz extracelular y el segundo material de matriz extracelular puede estar en forma de gel; el primer material de matriz extracelular puede tener una mayor concentración de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que el segundo material de matriz extracelular, y el segundo material de matriz extracelular tiene una mayor concentración de elastina que el primer material de matriz extracelular; el primer material de matriz extracelular puede tener una mayor concentración de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) que el segundo material de matriz extracelular, y el segundo material de matriz extracelular puede tener una mayor concentración de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) que el primer material de matriz extracelular; y/o el primer material de matriz extracelular puede tener una mayor concentración de factor de crecimiento epidérmico (EGF) que el segundo material de matriz extracelular, y el segundo material de matriz extracelular puede tener una mayor concentración de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que el primer material de matriz extracelular.

La presente divulgación incluye además una composición que comprende un primer material de matriz extracelular derivado de tejido del bazo, y un segundo material de matriz extracelular derivado de tejido del pulmón, en donde la composición incluye al menos dos capas, comprendiendo al menos una de las capas el segundo material de matriz extracelular integrado al menos parcialmente en el primer material de matriz extracelular, y en donde la composición está configurada para aplicación al tejido natural de un paciente para la reparación del tejido natural. Las realizaciones de la presente divulgación pueden incluir una o más de las siguientes características: el primer material de matriz extracelular puede derivar de una porción reticular del tejido del bazo, de forma que el primer material de matriz extracelular pueda ser al menos parcialmente poroso; el primer material de matriz extracelular también puede derivar de una membrana externa del tejido del bazo, de forma que el primer material de matriz extracelular pueda tener una porción de tipo hoja y una porción porosa, estando integrado el segundo material de matriz extracelular en la porción porosa del primer material de matriz extracelular; el segundo material de matriz extracelular puede estar en forma de partículas, forma de gel, o forma líquida; la composición puede tener una forma de tipo varilla configurada para implantación en el paciente; la composición puede comprender además un tercer material de matriz extracelular, en donde al menos una de las capas de la composición puede comprender el tercer material de matriz extracelular en forma de hoja, en donde el tercer material de matriz extracelular puede derivar de tejido del pulmón o tejido del bazo; y/o la composición puede tener una forma de tipo varilla o una forma tubular.

La presente divulgación incluye además una composición que comprende un primer material de matriz extracelular derivado de tejido del bazo, y un segundo material de matriz extracelular derivado de tejido del pulmón, estando el segundo material de matriz extracelular en forma de partículas, forma de gel, o forma líquida, en donde el primer material de matriz extracelular está en una forma diferente de la forma del segundo material de matriz extracelular, y en donde la composición está configurada para aplicación al tejido natural de un paciente para la reparación del tejido natural. En algunas realizaciones, al menos una porción del primer material de matriz extracelular puede estar en forma de hoja; y/o el primer material de matriz extracelular puede derivar de una porción reticular del tejido del bazo y una membrana externa del tejido del bazo, de forma que el primer material de matriz extracelular pueda tener una porción de tipo hoja y una porción porosa, en donde el segundo material de matriz extracelular se puede integrar en la porción porosa del primer material de matriz extracelular.

Breve descripción de las figuras

Los dibujos adjuntos, que se incorporan en esta memoria descriptiva y constituyen parte de ella, ilustran diversas realizaciones a modo de ejemplo y, junto con la descripción, sirven para explicar los principios de las realizaciones desveladas. Se puede combinar cualquier característica de una realización descrita en el presente documento (por ejemplo, composición, dispositivo médico, método de tratamiento, etc.) con cualquier otra realización, y están englobadas por la presente divulgación.

La Fig. 1 muestra una composición a modo de ejemplo, según una o más realizaciones de la presente divulgación.

La Fig. 2 muestra una composición a modo de ejemplo, según uno o más realizaciones de la presente divulgación.

Las Fig. 3A-3C muestran composiciones a modo de ejemplo según algunas realizaciones de la presente divulgación, en donde las Fig. 3B y 3C muestran diferentes vistas en sección transversal de una composición como se muestra en la Fig. 3A.

Las Fig. 4A y 4B muestran una composición a modo de ejemplo según una o más realizaciones de la presente divulgación.

Las Fig. 5A y 5B muestran una composición a modo de ejemplo según una o más realizaciones de la presente divulgación.

Descripción detallada

Las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen la referencia al plural, a menos que el contexto indique de otro modo.

Los términos "aproximadamente" y "alrededor de" se refieren a que son casi el mismo que un número o valor referenciando. Como se usa en el presente documento, se debe entender, en general, que los términos "aproximadamente" y "alrededor de" engloban ± 10 % de una cantidad especificada o valor.

Como se usa en el presente documento, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de una sustancia (por ejemplo, un agente, compuesto, material, etc.) que conduce al (a los) efecto(s) terapéutico(s) deseado(s), y el término "cantidad farmacéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de una sustancia (por ejemplo, un agente compuesto, material, etc.) que conduce al (a los) efecto(s) farmacológico(s) deseado(s). Aunque pueden variar las necesidades individuales del paciente, la determinación de intervalos óptimos para cantidades eficaces de las sustancias descritas en el presente documento (por ejemplo, materiales de MEC, factores de crecimiento, proteínas estructurales, agentes terapéuticos, agentes farmacéuticos, agentes antimicrobianos, etc.) está dentro de la experiencia de la técnica. Por ejemplo, se pueden seleccionar cantidades adecuadas o dosis de las sustancias en el presente documento según una variedad de factores, que incluyen el tipo, la edad, el peso, el sexo, la dieta, la afección médica y/o los antecedentes médicos del paciente.

La cicatrización y la regeneración de tejido es un proceso complejo de múltiples etapas dentro del cuerpo. Diversos y múltiples componentes participan en las diferentes etapas. El tejido lesionado o dañado requiere múltiples componentes, por ejemplo, proteínas estructurales y factores de señalización, para completar la curación en el sitio de lesión. Muchos de estos componentes se han identificado en materiales de MEC, que incluyen proteínas fibrosas, tales como diferentes tipos de colágeno, elastina, fibronectina y laminina. La MEC también puede comprender glucosaminoglicanos (GAG), tales como sulfato de heparina, y diversos factores de crecimiento. Durante la curación/reparación/regeneración del tejido, estos componentes desempeñan diversas funciones, que incluyen, pero no se limitan a, regulación por incremento y/o regulación por disminución de diferentes etapas del proceso de curación. En vez de una única biomolécula, varios componentes diferentes trabajan conjuntamente para facilitar la curación y la reparación en cada etapa. Frecuentemente se añaden varios tipos de factores de señalización para que ocurra una etapa específica del proceso de curación. Por ejemplo, un factor de crecimiento puede fijarse a una célula madre del hospedador para que migre al sitio de lesión. La célula hospedadora puede necesitar un sustrato o proteína estructural (por ejemplo, un tipo de colágeno específico, laminina o elastina) para la fijación o unión al sitio, y un factor de crecimiento diferente para la señalización para diferenciar en tejido específico de sitio.

La presente divulgación puede tratar uno o más de estos retos, por ejemplo, combinando proteínas estructurales y factores de crecimiento u otras moléculas de señalización o estructurales de diferentes tipos y/o fuentes de tejido para facilitar la reparación de tejido en un sitio de lesión específico.

Tipos de materiales

La presente divulgación incluye composiciones que comprenden materiales de MEC u otros materiales basados en colágeno para promover la reparación, el aumento y/o la regeneración de tejido. Por ejemplo, los materiales de MEC pueden servir de estructura de soporte y/o proporcionar factores de señalización para facilitar el crecimiento de tejido. Los materiales adecuados para la presente divulgación pueden derivar de cualquier tejido de fuente de mamífero que comprende MEC u otros materiales basados en colágeno, que incluyen, pero no se limitan a, tejidos del bazo, riñón, hígado, pulmón, páncreas, vesícula biliar, estómago, pericardio, ganglio linfático, médula ósea, dermis, placenta, saco amniótico, duramadre, y cualquier combinación de los mismos. El material de fuente de la MEC se puede usar en su totalidad o en parte.

Los materiales de MEC se pueden obtener de tejido retirando la totalidad del tejido (por ejemplo, un órgano) o una porción del mismo de la fuente de mamífero deseado, y desvitalizando el tejido retirando el contenido celular del tejido. El material de fuente de MEC puede comprender todas las capas de un tipo de tejido o un órgano entero, por ejemplo, o puede comprender solo una o más porciones de tejido, tales como la submucosa, la membrana basal, una capa túnica, la MEC reticular o la membrana externa de la fuente de tejido, tal como la pleura del pulmón o la cápsula del riñón. Los materiales de MEC de la presente divulgación pueden comprender cualquier combinación de estas porciones o capas de tejido diferentes. Los ejemplos de tipos de tejidos naturales adecuados para la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, tejido porcino, bovino, ovino y humano. En algunas realizaciones, la composición puede comprender uno o más tejidos distintos de mamífero, tales como tejido de pez, por ejemplo, piel de pez, opcionalmente en combinación con uno o más tejidos de mamífero.

En algunas realizaciones, la composición puede comprender materiales de MEC derivados de dos o más fuentes de tejido diferentes y/o dos o más tejidos naturales diferentes. Por ejemplo, las fuentes de tejido puede ser de la misma especie (por ejemplo, materiales de MEC derivados de diferentes tipos de tejidos del mismo mamífero), de diferentes especies (por ejemplo, materiales de MEC derivados del mismo tipo de tejido de diferentes tipos de mamíferos), o ambos (por ejemplo, materiales de MEC derivados de diferentes tipos de tejidos de diferentes tipos de mamíferos). En algunas realizaciones, la composición puede comprender MEC de bazo y/o MEC de pulmón de la misma especie o de especies diferentes. Por ejemplo, las realizaciones de la presente divulgación pueden incluir, pero no se limitan a, composiciones que comprenden lo siguiente:

- MEC de bazo porcino y MEC de pulmón porcino

- MEC de bazo bovino y MEC de bazo porcino
- MEC de pulmón bovino y MEC de bazo porcino
- MEC de pulmón bovino, MEC de bazo bovino y MEC de bazo porcino

La composición comprende MEC de bazo y al menos otro material de MEC elegido de pulmón, vesícula biliar, médula ósea, páncreas o hígado. Por ejemplo, la composición puede comprender MEC de bazo, MEC de pulmón y/o al menos otro material de MEC. Otras combinaciones de materiales de MEC serán evidentes en vista de la divulgación en el presente documento.

Además de los materiales de MEC, las composiciones pueden comprender uno o varios de otros compuestos o materiales, tales como materiales sintéticos o naturales resorbibles, materiales sintéticos o naturales no resorbibles, polímeros, metales, material de hueso, tejidos o huesos de aloinjerto, agentes antimicrobianos, agentes terapéuticos, agentes farmacéuticos (fármacos), o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la composición se puede formular para administración al paciente y/o configurar como un dispositivo médico o componente del mismo para aplicación o implantación en un paciente.

En algunas realizaciones, por ejemplo, la composición puede comprender MEC de bazo y de pulmón, opcionalmente en combinación con uno o varios de otros tipos de materiales de MEC y/o uno o más componentes no de MEC. Por ejemplo, una composición de MEC de bazo y de pulmón puede comprender uno o varios de otros tipos de materiales de MEC que incluyen, pero no se limitan a, MEC de membrana del corazón, MEC de pericardio, MEC de páncreas, MEC de fascia, MEC de duramadre, MEC de epiplón, MEC de vesícula biliar, MEC de saco amniótico, MEC de cápsula renal, MEC de hígado o MEC de médula ósea. En al menos una realización, la composición puede comprender MEC de bazo, MEC de pulmón y uno o más componentes no de MEC elegidos de polímeros, hidrogeles o ácido hialurónico.

Preparación/tratamiento de materiales de MEC

Los métodos de preparación de tejido desvitalizado o acelular pueden incluir procesos físicos, químicos y/o biológicos. Por ejemplo, se puede recoger tejido de mamífero y ser sometido a un proceso de limpieza física para retirar grasa, músculo y otro material celular ajeno a la MEC. Dichos procesos físicos pueden incluir acciones mecánicas basadas en máquinas y/o fuerza aplicada manualmente. Además, o alternativamente, el tejido se puede someter a procesos químicos y/o biológicos para romper las células y retirar material celular. Por ejemplo, el tejido se puede exponer a uno o más agentes químicos o biológicos que incluyen, pero no se limitan a, un ácido (por ejemplo, HCl, ácido acético, ácido peracético), una base (por ejemplo, NaOH), un agente quelante (por ejemplo, ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), ácido etilenglicoltetraacético (EGTA)), un detergente (por ejemplo, dodecilsulfato de sodio, Triton-X, CHAPS) y/o una enzima (por ejemplo, nucleasa, tripsina, colagenasa). Los ejemplos adicionales de procesos de descelularización incluyen homogeneización a alta presión y lavados hipotónicos o hipertónicos para romper las células en materiales de MEC y lavado del material celular. Los materiales de MEC se pueden secar, por ejemplo, a temperatura ambiente y presión o a vacío, congelar y/o almacenar antes de uso. Los métodos de secado de materiales de MEC adecuados para la presente divulgación incluyen cámaras de desecación, cámaras de humedad controlada, secado por flujo de aire forzado y liofilización (secado por congelación).

Se pueden seleccionar el (los) proceso(es) implicado(s) en la descelularización para conservar uno o más materiales biológicos de interés. La descelularización puede ser diferente para cada tipo de tejido, basándose en los componentes deseados y/o la estructura que se va a retener, y el tratamiento adecuado para la retención de los componentes y/o la estructura. Las realizaciones de la presente divulgación comprenden materiales de MEC derivados de al menos dos tipos diferentes de tejido, cada tejido se somete a uno o más procesos de descelularización seleccionados para retener características particulares del tejido.

En algunas realizaciones, por ejemplo, se puede descelularizar tejido de pulmón con detergentes, tales como dodecilsulfato de sodio o Triton-X, para retener tanta elastina del material como sea posible, mientras se sacrifica algo del contenido de factor de crecimiento. Además de la elasticidad, otros beneficios del uso de MEC de pulmón pueden incluir la impermeabilidad a los líquidos, por ejemplo, para prevenir que se fugue el líquido de dentro de la composición y/o para prevenir que los líquidos corporales penetren en la composición o la atraviesen. Además, la MEC de pulmón se pueden procesar en de tal forma que proporcione un superficie relativamente lisa que desaliente la fijación del tejido de paciente a la composición, mientras que la superficie opuesta puede tener una estructura más porosa que facilite la fijación celular. La MEC de pulmón también puede ser particularmente adecuada para aplicaciones que requieren materiales con propiedades de estiramiento y/o rebote, tales como aplicaciones de cistoplastia de aumento, injerto vascular o de parche vascular. Además, la MEC de pulmón puede ser relativamente delgada (por ejemplo, derivada de tejido del pulmón que es relativamente delgado en comparación con otros tipos de tejidos), que puede proporcionar una beneficiosa relación resistencia-peso en comparación con otros tipos de materiales de MEC.

El tejido del bazo, por otra parte, puede ser descelularizado para conservar tanto contenido de factor de crecimiento

como sea posible tratando el tejido con un lavado con ácido más suave, tal como ácido peracético que tiene una concentración que varía desde aproximadamente el 0,01 % hasta aproximadamente el 5,00 %, tal como aproximadamente el 0,1 %. El tejido del bazo descelularizado se puede aclarar con solución salina tamponada y/o agua para retener una cantidad máxima de factor de crecimiento. La estructura reticular de la MEC de bazo puede proporcionar espacios intersticiales adecuados para acomodar otros tipos de materiales de MEC (por ejemplo, en forma de partículas, gel o pasta), biomoléculas, agentes antimicrobianos (véase la discusión más adelante) y/o agentes farmacéuticos. Además, la estructura reticular de la MEC de bazo, por ejemplo, en combinación con los factores de crecimiento retenidos en la matriz, puede fomentar y soportar el crecimiento de nuevas células dentro de la matriz para promover el injerto de tejido. Por ejemplo, la MEC de bazo puede ser particularmente adecuada para la hemostasia y aplicaciones de cirugía reconstructiva.

En algunas realizaciones, se puede procesar tejido del bazo para generar material de MEC que comprende solo una porción, por ejemplo, una porción fibrosa, del tejido natural. Por ejemplo, solo la membrana externa del bazo se puede usar para generar MEC de bazo en forma de hoja. Además, por ejemplo, solo la MEC de bazo reticular se puede usar para generar una hoja de MEC fibroso de estructura abierta. En otro ejemplo más, tanto la membrana externa como el componente de MEC de bazo reticular se pueden usar de forma que sigan intactos, por ejemplo, para generar un material de MEC que tiene una estructura de tipo hoja relativamente más densa sobre una cara con una estructura de tipo esponja relativamente más porosa o fibrosa en la otra cara.

Durante el procesamiento, los materiales de MEC se pueden encoger cuando se secan y luego cuando se expanden hasta un cierto grado cuando se rehidratan, por ejemplo, a medida que absorben líquido. Por ejemplo, un material de MEC en forma de hoja puede tener aproximadamente 200 µm de espesor cuando se seca, y puede aumentar hasta un espesor desde aproximadamente 300 µm hasta aproximadamente 500 µm cuando se rehidrata. La arquitectura fibrosa natural de los tejidos, tales como el bazo, puede permitir más expansión, por ejemplo, ya que el componente de MEC reticular que existe de forma natural tiene, en general, un "espacio muerto" para permitir la compresión y la expansión cuando se rehidrata. Los materiales de MEC se pueden procesar para ajustar las características de compresión/rehidratación/expansión del tejido natural.

En algunas realizaciones, la composición puede comprender una pluralidad de materiales de MEC, en donde al menos uno de los materiales de MEC comprende una variedad diferente de componentes y/o una cantidad o concentración diferente de un componente dado que otro material de MEC en la composición. Además, en algunas realizaciones, la composición comprende dos o más materiales de MEC que comprenden algunos o todos de la misma variedad de componentes, pero diferentes cantidades o concentraciones de los componentes. En algunas realizaciones, la composición puede comprender dos o más materiales de MEC que comprenden algunos o todos de la misma variedad de componentes y/o sustancialmente la misma cantidad o concentración (o una cantidad o concentración similar) de un componente dado como otro material de MEC en la composición. Estos componentes pueden incluir proteínas, glucoproteínas, glucosaminoglicanos, proteoglicanos, citocinas y/o factores de crecimiento. Por ejemplo, la composición puede comprender materiales de MEC que tienen sustancialmente las mismas cantidades, similares, o diferentes, de uno o más de los siguientes componentes: colágeno, elastina, fibronectina, laminina, sulfato de heparina, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factores de crecimiento transformante alfa (TGF-α), factores de crecimiento transformante beta (TGF-β), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), proteínas morfogenéticas óseas (BMP), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor-9 de diferenciación del crecimiento (GDF9), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento esquelético (SGF), factor de crecimiento derivado de osteoblastos (BDGF), factores de crecimiento de citocinas (CGF), factor derivado de células madre (SDF), factor de células madre (SCF), factor de crecimiento placentario (PGF) y/o interleucinas de cualquier tipo y dentro de cualquier familia (por ejemplo, IL-1, IL-2, etc.).

Se pueden detectar componentes biológicos y cuantificar en los materiales de MEC y/o en los tejidos naturales por enzimoinmunoanálisis de adsorción (ELISA), o cualquier otra técnica adecuada. La Tabla 1 enumera factores de crecimiento medidos en diferentes materiales de MEC porcina: submucosa del intestino delgado (SID), submucosa de la vejiga urinaria (SVU), submucosa del estómago (SE), bazo y pulmón. Las mediciones de SE, bazo y pulmón se describen en el Ejemplo 1.

Tabla 1: Factores de crecimiento en materiales de MEC porcina.

	SID (ng/g)[1]	**SVU (pg/g)[2]**	**SE (ng/mg)[3,4]**	**Bazo (ng/mg)[3,5]**	**Pulmón (ng/mg)[3,6]**
VEGF	0,77	104,6 ± 25,4	10,5 ± 1,6	8,7 ± 1,2	11,4 ± 2,7
FGF	97,9 ± 11,7	4,0427 ± 0,0075	0,6	1,0	1,1
TGF-β	768,1 ± 182,1	8,8490 ± 0,001	--	--	--
PDGF	--	285,62 ± 4,54	6,1	6,5	6,1
IGF	--	6,9 ± 3,4	0,4	1,6	2,8
EGF	--	0,99 ± 0,15	3,5 ± 2,4	5,2 ± 0,6	5,0 ± 1,6
KGF	--	158,8 ± 45,4	--	--	--

(continuación)

	SID (ng/g)[1]	SVU (pg/g)[2]	SE (ng/mg)[3,4]	Bazo (ng/mg)[3,5]	Pulmón (ng/mg)[3,6]

[1] Hodde et al., Endothelium, vol. 8, pp. 11-24 (2001); McDevitt et al., J. Biomed. Mater. Res., vol. 67A, pp. 637-640 (2003); Hodde et al., Wounds, vol. 13, pp. 195-201 (2001).
[2] Chun et al., Biomaterials, vol. 28, pp. 4251-4256 (2007).
[3] Valor más alto medido de cualquier líquido de extracción.
[4] Valores (ng/mg) con extracción con PBS, VEGF = 8,7 ± 0,4, PDGF = 6,1, EGF = 3,5 ± 2,4; con extracción con tampón RIPA, VEGF = 6,3 ± 0,2, IGF = 0,1, EGF = 1,9 ± 0,7; con extracción con ácido acético, VEGF = 10,5 ± 1,6, FGF = 0,6, PDGF = 3,4, IGF = 0,4, EGF = 2,2 ± 0,8.
[5] Valores (ng/mg) con extracción con PBS: VEGF = 8,2 ± 0,1, PDGF = 6,5, IGF = 0,1, EGF = 5,2 ± 0,6; con extracción con tampón RIPA: VEGF = 6,6 ± 0,4, IGF = 0,2, EGF = 5,0 ± 0,6; con extracción con ácido acético: VEGF = 8,7 ± 1,2, FGF = 1,0, PDGF = 6,4, IGF = 1,6, EGF = 4,1 ± 0,5.
[6] Valores (ng/mg) con extracción con PBS: VEGF = 3,8 ± 0,2, PDGF = 6,1, IGF = 0,03, EGF = 5,1 ± 1,6; con extracción con tampón RIPA: VEGF = 3,2 ± 0,1, IGF = 0,1, EGF = 3,6 ± 0,8; con extracción con ácido acético: VEGF = 11,4 ± 2,7, FGF = 1,1, PDGF = 4,9, IGF = 2,8, EGF = 3,5 ± 1,0.

El contenido de factor de crecimiento medido puede variar según el tipo de líquido de extracción y/o método usado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el contenido de diferentes factores de crecimiento en la MEC de submucosa de estómago puede variar desde aproximadamente 6,3 ± 0,2 ng/mg hasta aproximadamente 10,5 ± 1,6 ng/mg de VEGF, desde aproximadamente 3,4 ng/mg hasta aproximadamente 6,1 ng/mg de PDGF, desde aproximadamente 0,1 ng/mg hasta aproximadamente 0,4 ng/mg de IGF y/o desde aproximadamente 1,9 ± 0,7 ng/mg hasta aproximadamente 3,5 ± 2,4 ng/mg de EGF. En algunas realizaciones, el contenido de diferentes factores de crecimiento en MEC de bazo puede variar desde aproximadamente 6,6 ± 0,4 ng/mg hasta aproximadamente 8,7 ± 1,2 ng/mg de VEGF, desde aproximadamente 6,4 ng/mg hasta aproximadamente 6,5 ng/mg de PDGF, desde aproximadamente 0,1 ng/mg hasta aproximadamente 1,6 ng/mg de IGF y/o desde aproximadamente 4,1 ± 0,5 ng/mg hasta aproximadamente 5,2 ± 0,6 ng/mg de EGF. En algunas realizaciones, el contenido de diferentes factores de crecimiento en MEC de pulmón puede variar desde aproximadamente 3,2 ± 0,1 ng/mg hasta aproximadamente 11,4 ± 2,7 ng/mg de VEGF, desde aproximadamente 4,9 ng/mg hasta aproximadamente 6,1 ng/mg de PDGF, desde aproximadamente 0,03 ng/mg hasta aproximadamente 2,8 ng/mg de IGF y/o desde aproximadamente 3,5 ± 1,0 ng/mg hasta aproximadamente 5,1 ± 1,6 ng/mg de EGF.

La MEC de bazo y de pulmón tienen cada uno, en general, mayor contenido de factor de crecimiento que SID, SVU (o matriz de la vejiga urinaria, MVU) y MEC de SE. Mientras que cada uno de estos cinco tipos de materiales de MEC comprende múltiples tipos de colágeno, la MEC pulmón tiene, en general, la mayor cantidad de elastina. La elastina puede proporcionar mejores resultados clínicos cuando se usa en aplicaciones que requieren estiramiento y rebote, tales como la distensibilidad en una aplicación de injerto vascular o de parche vascular. Todos de la MEC de SID, SVU/MVU, SE y de pleura de pulmón se producen naturalmente en forma de hoja, mientras que el bazo se puede procesar para retener gran parte del componente de MEC reticular. La estructura reticular proporciona una MEC tridimensional natural con una red de MEC fibrosa macroscópica. Esta MEC reticular de bazo macrofibrosa natural puede ser beneficiosa para una variedad de aplicaciones médicas, tales como la reparación de defectos en la cirugía plástica y reconstructiva, el uso como una capa en un injerto quirúrgico, tal como la reparación de hernia para facilitar mejor la penetración de tejidos, como un dispositivo de hemostasia, o como una armazón natural para una mejor incorporación de otros componentes de MEC o no de MEC, tales como partículas, geles y polímeros.

Las composiciones según la presente divulgación pueden comprender las mismas cantidades o diferentes de cada material de MEC. En algunas realizaciones, la composición puede comprender dos materiales de MEC diferentes, por ejemplo, en una relación que varía desde aproximadamente 50:50 (es decir, 1:1) hasta aproximadamente 5:95 (es decir, 1:19). Por ejemplo, la composición puede comprender una relación 50:50 de dos materiales de MEC diferentes (por ejemplo, MEC de bazo y MEC de pulmón), o una relación de 60:40, 70:30, 80:20, 90:10, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, o cualquier otra relación intermedia. Por ejemplo, la composición puede comprender tejidos de pulmón y de bazo en una relación 1:3 (por ejemplo, aproximadamente 25 % de MEC de pulmón y aproximadamente 75 % de MEC de bazo, o aproximadamente 25 % de MEC de bazo y aproximadamente 75 % de MEC de pulmón). En algunas realizaciones, la composición puede comprender más de dos materiales de MEC diferentes, por ejemplo, tres, cuatro, cinco o más materiales de MEC, en cantidades iguales o desiguales. Por ejemplo, la composición puede comprender tres materiales de MEC diferentes que tienen una relación de 40:40:20, 30:30:40 o 20:20:60, entre otras relaciones posibles. En algunas realizaciones, por ejemplo, la composición puede comprender aproximadamente 25 % de MEC de bazo, aproximadamente 25 % de MEC de pulmón y aproximadamente 50 % de MEC de vesícula biliar. Se puede seleccionar cualquier relación deseada basándose en la composición final deseada.

Las relaciones de materiales de MEC en la composición se pueden elegir basándose en las características individuales de los materiales de MEC y la aplicación deseada para la composición. Las aplicaciones de medicina regenerativa para las que se pueden ajustar las relaciones de materiales de MEC, por ejemplo, para aprovechar las características físicas, mecánicas y/o biológicas de cada material de MEC incluyen, pero no se limitan a, apósitos para heridas, reparación de duramadre, tapones para fístula, parches miocárdicos, inyecciones miocárdicas, reparación de válvulas cardíacas, injertos de timpanoplastia, reparación de defectos del tabique nasal, hernia o reparación de paredes del cuerpo, injertos para hemostasia, cabestrillos de urología, injertos de tráquea, injertos

esofágicos, parches pulmonares, injertos de intestino delgado, cabezales para grapas, injertos de nervios, reparación de la médula espinal, manguito para los nervios, guía nerviosa, injertos de suelo pélvico, parches de saco amniótico, reparación de córnea, reparación de cartílago, reparación de hueso, reparación de tendones/ligamentos, reparación de músculos, aplicaciones de cirugía plástica y reconstructiva, labioplastia de aumento, aumento facial, reconstrucción del pezón, reparación del conducto biliar, reparación del uréter, reparación de la uretra e injerto de acceso vascular. Variando la relación y los tipos de materiales de MEC aplicados en una aplicación médica, se puede proporcionar mayores niveles de factores de señalización y/u otros componentes necesarios para cada tipo de reparación de tejido específica.

En las aplicaciones para el cuidado de heridas, por ejemplo, se puede desear una mayor relación entre MEC de bazo y MEC de pulmón para utilizar un contenido de EGF relativamente mayor en tejido del bazo mientras que también se aprovecha un contenido de VEGF relativamente mayor en tejido del pulmón. Para las aplicaciones de injerto vascular, se puede desear una mayor relación entre MEC de pulmón y MEC de bazo para aprovechar el mayor contenido de elastina y reducir la permeabilidad a gases/líquidos del tejido de pulmón, mientras se utiliza un contenido de PDGF relativamente mayor en el tejido del bazo. En algunas realizaciones, la composición puede comprender una composición de injerto de tejido que comprende una pluralidad de materiales de MEC, en donde al menos dos de los materiales de MEC derivan de diferentes fuentes de tejido y tienen diferente contenido de factor de crecimiento o contenido de proteína.

Formas de los materiales

Las composiciones pueden comprender materiales de MEC o materiales basados en colágeno en una variedad de formas diferentes, y se pueden administrar a un paciente como una formulación (por ejemplo, un líquido para inyección o polvo para inhalación), o administrar como parte de un dispositivo médico (por ejemplo, una venda tópica o dispositivo médico implantable). Por ejemplo, los materiales de MEC o materiales basados en colágeno se pueden conformar en una hoja, varilla, tubo, construcción tridimensional, malla, esponja, líquido, gel, hidrogel, emulsión, partículas, polvo (por ejemplo, partículas finas), suspensión, pasta, masilla, dispersión, espuma, o cualquier combinación de los mismos, entre otras formas posibles. La composición puede comprender una combinación de materiales de MEC o materiales basados en colágeno en formas diferentes, tales como hoja y polvo, polvo y gel, hoja y gel, esponja y líquido, esponja y gel, hoja/polvo/gel, hoja/polvo/hoja, hoja/gel/hoja, hoja/gel/polvo/hoja, esponja/hoja, esponja/gel, esponja/polvo, esponja/polvo/hoja, esponja/gel/hoja, esponja/polvo/gel/hoja, espuma/polvo, espuma/gel, espuma/hoja, espuma/polvo/hoja y espuma/polvo/gel/hoja, entre otras combinaciones.

En algunas realizaciones, la composición puede comprender un material de MEC multicapa, por ejemplo, dos o más capas de materiales de MEC acopladas juntas, en donde cada capa puede comprender materiales de MEC en las mismas formas o diferentes, y/o de las mismas fuentes o diferentes. Las capas se pueden unir juntas o reticular, tal como reticulación de capas de hojas múltiples juntas por un proceso químico. La reticulación se puede lograr mediante diversos métodos y procesos conocidos, en general, por un experto habitual en la técnica, que incluye procesos químicos y/o bioquímicos, métodos basados en la temperatura, métodos basados en la presión, procesos que incluyen exposición a la luz y métodos basados en energía. La reticulación se puede lograr por reticulación diferencial, por ejemplo, realizando reticulación dirigida para lograr la unión de diferentes capas de tejido o componentes de MEC en ubicaciones o regiones específicas. La reticulación se puede usar para generar diferentes propiedades de elasticidad y/u otras propiedades mecánicas en los sitios o regiones reticulados, permitiendo esto que la composición se adapte para una aplicación específica, o para generar un tamaño y/o forma deseados para una aplicación específica.

En algunas realizaciones, los materiales de MEC pueden retener la estructura del tejido natural. Por ejemplo, se puede producir una hoja por descelularización de tejido natural que tiene una estructura de tipo hoja, tal como capas de membrana (por ejemplo, fascia o dermis) o submucosa, mientras que se puede producir una estructura de esponja o de tipo armazón por descelularización de tejido natural que tiene estructura intersticial, por ejemplo, órganos tales como el bazo, el riñón, el páncreas o el hígado. Además, por ejemplo, se pueden producir materiales de MEC de tipo varilla a partir de tejidos naturales que tienen, en general, una estructura de tipo varilla o cilíndrica, tales como tendones y nervios; y se pueden producir materiales de MEC tubulares a partir de tejidos naturales que tienen una estructura tubular, tales como vasos sanguíneos, la tráquea o el esófago.

En algunas realizaciones, los materiales de MEC o materiales basados en colágeno se pueden manipular o alterar químicamente en una forma sustancialmente diferente de la forma del tejido natural. Por ejemplo, la composición puede comprender uno o más materiales de MEC o basados en colágeno reducidos a la forma de partículas por trituración, machacado, molienda u otro proceso mecánico. Las partículas se pueden usar en la composición directamente, o se pueden combinar con un líquido adecuado o gel para formar una pasta o dispersión para administración. Además, por ejemplo, uno o más materiales de MEC se puede disolver en un líquido o gel, por ejemplo, por digestión enzimática u otro proceso biológico o químico. El líquido o gel se puede usar en la composición directamente, o se puede combinar con un líquido adecuado o gel para formar una emulsión para administración. En algunas realizaciones, la estructura del (de los) material(es) de MEC se puede modificar, por ejemplo, por un proceso químico para desnaturalizar las proteínas de la MEC, para proporcionar elevada porosidad.

Para las composiciones en partículas (también denominados polvos en el presente documento), las partículas pueden variar desde aproximadamente 100 nm hasta aproximadamente 2000 µm de diámetro. La distribución del tamaño de partículas de una composición se puede seleccionar basándose en la aplicación deseada. Por ejemplo, las partículas que varían desde aproximadamente 100 nm hasta aproximadamente 5 µm de diámetro, por ejemplo, desde aproximadamente 1 µm hasta aproximadamente 5 µm de diámetro, pueden ser adecuadas para administración por inhalación, mientras que las partículas que varían desde aproximadamente 1000 µm hasta aproximadamente 2000 µm de diámetro puede ser adecuadas para su uso en aplicaciones de llenado de huecos o de aumento. Además, por ejemplo, las partículas que varían desde aproximadamente 50 µm hasta aproximadamente 100 µm de diámetro pueden ser adecuadas para una variedad de aplicaciones de inyección terapéutica, mientras que las partículas que varían desde aproximadamente 100 µm hasta aproximadamente 1000 µm de diámetro pueden ser adecuadas para aplicaciones para heridas tópicas, y las partículas que varían desde aproximadamente 10 µm hasta aproximadamente 50 µm pueden ser adecuadas para aplicaciones de reparación de la córnea (por ejemplo, las partículas que se combinan con un líquido adecuado y se administran al ojo por una suspensión, tal como con colirios). Estos intervalos de tamaño están previstos como pautas generales solo, y pueden variar según la aplicación médica y/o las necesidades particulares de un paciente.

En algunas realizaciones, se pueden manipular combinaciones de materiales de MEC en una única forma individual o construcción compuesta. Por ejemplo, trozos o tiras de diferentes materiales de hoja de MEC acoplados juntos para formar una hoja de material compuesto de MEC. Los trozos o tiras de diferentes materiales de MEC pueden estar agujeteados, grapados o acoplados juntos con un adhesivo adecuado, o reticulados o unidos químicamente juntos. En algunas realizaciones, la composición puede comprender porciones de MEC de bazo de tipo hoja acopladas con porciones de MEC de pulmón de tipo hoja, por ejemplo, para formar una hoja de MEC de material compuesto. Similarmente, las porciones de diferentes materiales de MEC se pueden acoplar juntas para formar una única varilla, tubo, construcción tridimensional, malla, esponja, u otra forma adecuada de material de MEC.

Como se ha mencionado anteriormente, las estructuras y los componentes de diferentes materiales de MEC pueden proporcionar diferentes beneficios, de forma que la combinación de dos o más tipos de materiales de MEC pueda proporcionar composiciones exclusivamente adaptadas a las necesidades específicas de un paciente. Las composiciones se pueden diseñar para aprovechar los componentes de señalización que existen de forma natural en los tejidos de los que derivan los materiales de MEC, que incluyen, pero no se limitan a, VEGF, FGF, EGF, TGF-β, PDGF y/o IGF.

Por ejemplo, la composición puede comprender dos o más materiales de MEC en forma de partículas, con las relaciones de los materiales de MEC ajustadas para proporcionar una composición con un contenido deseado de componentes deseados, que incluyen, pero no se limitan a, factor de crecimiento y/u otros componentes de señalización. La composición se puede aplicar en forma de partículas a un sitio en necesidad de reparación, o se puede inyectar/administrar como una suspensión o partículas en combinación con un vehículo (por ejemplo, disolución líquida). Las aplicaciones para composiciones en partículas incluyen, pero no se limitan a, reparación nerviosa, reparación de disco espinal, tratamiento de artritis, restauración capilar, regeneración ósea, aumento óseo, reparación de cartílago, reparación de tendón, reparación de ligamentos, tratamiento de quemaduras, regeneración de vainas de mielina, reparación de la córnea y reparación pulmonar.

Agente(s) antimicrobiano(s)

En algunas realizaciones, la composición puede tener propiedades antimicrobianas, por ejemplo, para reducir, eliminar, prevenir o controlar de otro modo la actividad microbiana tras la aplicación de la composición a un paciente. Por ejemplo, la composición puede comprender uno o más agentes antimicrobianos. Los agentes antimicrobianos adecuados incluyen, pero no se limitan a, plata y compuestos y aleaciones de los mismos (por ejemplo, plata, óxido de plata, nitrato de plata, sulfazidina de plata, plata-imidazolato, fosfato de plata), cinc y compuestos y aleaciones de los mismos (por ejemplo, cinc, cloruro de cinc, óxido de cinc, sulfato de cinc monohidratado, cinc-hidroxiapatita, latón), cobre y compuestos y aleaciones de los mismos (por ejemplo, cobre, latón, bronce), bismuto y compuestos y aleaciones de los mismos, compuestos de biguanida (por ejemplo, polihexametilenbiguanida, clorhexadina, poliaminopropilbiguanida, alexidina), cloruro de benzalconio, triclosán (5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenol), fármacos antibióticos, tales como neomicina y bacitracina, miel, coco, productos basados en coco, aceites esenciales y extractos vegetales. En algunas realizaciones, se puede usar una combinación de agentes, por ejemplo, para proporcionar un amplio espectro de actividad antimicrobiana. Por ejemplo, el (los) agente(s) antimicrobiano(s) pueden ser eficaces contra bacterias, levaduras, hongos y/o virus extracelulares, por ejemplo, inhibiendo las actividades, el transporte y/o la reproducción de células microbianas. El (Los) agente(s) antimicrobiano(s) se pueden seleccionar basándose en la compatibilidad con otros componentes de la composición y/o las necesidades médicas del paciente. En algunas realizaciones, la cantidad de agente(s) antimicrobiano(s) en la composición se puede elegir basándose en el efecto antimicrobiano deseado sobre el paciente que se va a tratar con la composición.

Los agentes antimicrobianos se pueden aplicar a cualquier superficie de, o incorporar de otro modo en, uno o más materiales de MEC de la composición o la composición en conjunto. Si bien la siguiente discusión se referirá a la deposición de agentes antimicrobianos sobre materiales de MEC, se entiende, en general, que los agentes antimicrobianos se pueden aplicar alternativamente o adicionalmente a múltiples tipos de materiales de MEC

simultáneamente, tales como la aplicación a una composición que comprende diferentes tipos de materiales de MEC.

El agente antimicrobiano puede comprender un sólido, un líquido, una disolución (por ejemplo, un sólido disuelto o dispersado en un disolvente líquido), o un vapor. Para depositar agentes antimicrobianos en forma líquida, o un sólido en disolución, los materiales de MEC se pueden sumergir en el líquido/disolución o el líquido/disolución aplicado a diversas porciones de los materiales de MEC. Los materiales de MEC se pueden secar, por ejemplo, por evaporación, tras calentar, a presión reducida, en condiciones de humedad controlada o cámaras de desecación, o bajo flujo de aire forzado. En el caso de una disolución, por ejemplo, la evaporación del disolvente puede dejar atrás el agente antimicrobiano sólido como un depósito o capa delgada sobre los materiales de MEC. En algunas realizaciones, los materiales de MEC recubiertos de antimicrobiano se pueden degradar en trozos más pequeños o partículas que se van a incorporar en una composición y/o para administración a un paciente en forma de partículas. El agente antimicrobiano puede estar químicamente y/o bioquímicamente unido al sustrato de MEC.

El método de aplicación del (de los) agente(s) antimicrobiano(s) se puede seleccionar basándose en la forma de los materiales de MEC o la composición. En el caso de una hoja se puede aplicar, por ejemplo, un agente antimicrobiano a una o ambas caras de la hoja. Para una estructura multicapa (véanse, por ejemplo, las Fig. 1 y 3, tratadas a continuación), el agente antimicrobiano se puede aplicar únicamente a las capas más externas, una combinación de capas externas e internas, o únicamente las capas internas. Por ejemplo, se puede ensamblar una composición multicapa tratando una o más hojas con un agente antimicrobiano, disponiendo en capas las hojas para formar múltiples capas, y opcionalmente reticulando las capas juntas. En el caso de una estructura reticular o de tipo armazón, la matriz de MEC se puede sumergir en una disolución que comprende el agente antimicrobiano, de forma que la disolución pueda atravesar la matriz, o el agente antimicrobiano en forma de partículas pueda estar directamente incorporado en la matriz. En algunas realizaciones, un agente antimicrobiano se puede localizar dentro de la matriz de MEC aplicando la disolución para seleccionar porciones de la matriz.

En algunas realizaciones, el agente antimicrobiano se puede depositar de la fase vapor. Por ejemplo, el material antimicrobiano a depositar puede comprender cristales que tienen una estructura de red cristalina generada en la fase vapor, por ejemplo, por evaporación o pulverización, y se transporta en un volumen en el que la temperatura está controlada. Los átomos de material antimicrobiano pueden colisionar con el gas de trabajo, que hace que pierdan energía, de forma que el material antimicrobiano condense de la fase vapor sobre un sustrato enfriado, tal como un dedo enfriado con nitrógeno líquido. Para la plata, la deposición se pueden realizar a bajas temperaturas del sustrato, por ejemplo, que varían desde aproximadamente -10 °C hasta aproximadamente 100 °C.

En algunas realizaciones, la composición puede comprender partículas de plata (micropartículas y/o nanopartículas). La plata puede estar en forma iónica, por ejemplo, partículas que comprenden una sal de plata. La plata se puede aplicar como un recubrimiento de pulverización o añadir como una disolución a los materiales de MEC y luego secar. Por ejemplo, las partícula de plata se pueden dispersar en agua u otro disolvente para formar una disolución, la disolución se aplica a una o más superficies de los materiales de MEC, y se deja que el disolvente se evapore de forma que las partículas de plata permanezcan como un recubrimiento antimicrobiano sobre los materiales de MEC. Además, por ejemplo, las partículas se pueden incorporar directamente dentro de una matriz de MEC sin dispersar las partículas en disolución. En algunas realizaciones, la composición puede comprender partículas de MEC recubiertas de plata, por ejemplo, producidas recubriendo partículas de MEC o reduciendo materiales de MEC en forma de partículas. En algunas realizaciones, la plata se puede aplicar por otros métodos de recubrimiento, tales como deposición por haz de iones. La plata se puede incorporar antes o después de secar los materiales de MEC (por ejemplo, siguiendo un proceso de descelularización), o se puede incorporar en una forma en partículas, líquida, de emulsión o de gel de los materiales de MEC.

En algunas realizaciones, el contenido de plata de los materiales de MEC (concentración superficial) puede variar desde aproximadamente 1 mg/100 cm^2 hasta aproximadamente 1000 mg/100 cm^2, tal como desde aproximadamente 1 mg/100 cm^2 hasta aproximadamente 100 mg/100 cm^2. En algunas realizaciones, el contenido de plata de los materiales de MEC (concentración en masa) puede variar desde aproximadamente 1 mg/g hasta 100 mg/g, tal como desde aproximadamente 1 mg/g hasta aproximadamente 20 mg/g. En algunas realizaciones, la plata puede proporcionar un recubrimiento sobre los materiales de MEC, en donde el espesor del recubrimiento de plata puede variar desde aproximadamente 100 Å hasta aproximadamente 5 µm, tal como desde aproximadamente 500 Å hasta aproximadamente 2 µm.

Administración/aplicaciones a modo de ejemplo

Las composiciones según la presente divulgación se pueden diseñar para administración externa y/o interna a un paciente. Las composiciones se pueden aplicar a un sitio anatómico distinto de aquél del material (materiales) de fuente de MEC, o al (a los) mismo(s) sitio(s) anatómico(s). El tejido del paciente en necesidad de reparación, aumento o regeneración puede incluir, pero no se limita a, tejido de piel, músculo, tendón, ligamento, nervio, vascular, duramadre, córnea, hueso, corazón, hígado, pulmón, bazo, páncreas, estómago, intestino o cerebral. Los materiales de MEC pueden derivar de tejido que es alógeno, autólogo o xenógeno para el paciente que está tratándose.

En algunas realizaciones, al menos una porción o toda la composición puede ser biodegradable/resorbible, por ejemplo, de forma que la composición no necesite ser retirada después de la aplicación o implantación en un paciente. Por ejemplo, al menos una porción de la composición se puede configurar para ser absorbida o resorbida, para disolverse, o para degradarse, en aproximadamente 24 horas, 48 horas, 72 horas, 1 semana, 2 semanas, 1 mes, 3 meses o 6 meses desde la aplicación o implantación. Los materiales de MEC pueden ser completamente resorbibles, solo parcialmente resorbibles, o no resorbibles. Por ejemplo, los materiales de MEC se pueden procesar para modificar sus características de absorción, tales como por reticulación con glutaraldehído u otro agente de reticulación adecuado. Además de materiales de MEC, que puede ser resorbibles o no resorbibles, la composición puede comprender uno o más materiales resorbibles/biodegradables naturales o sintéticos, tales como colágeno, hidroxilapatita, polilactidas, poliglicolidas, policaprolactonas, ácido hialurónico, gelatina, vidrio bioactivo, trifosfato de calcio, aloinjertos de tejido blando o aloinjertos de tejido duro.

La composición se puede configurar para aplicación temporal, por ejemplo, una venda temporal o dispositivo médico implantable, que se va a retirar después de una cierta cantidad de tiempo, tal como después de aproximadamente 1 semana, 2 semanas, 1 mes, 3 meses, 6 meses, 9 meses o 1 año. Por ejemplo, la composición puede comprender una venda de hemostasia para ayudar a detener el sangrado de una herida, de forma que la venda se pueda retirar una vez se ha detenido el sangrado y/o para la reparación quirúrgica de la herida. Además, por ejemplo, la composición puede comprender un recubrimiento sobre un dispositivo médico configurado para la implantación temporal en el cuerpo, tal como una prótesis endovascular o un catéter, o un conductor del marcapasos previsto para ser retirado en una fecha posterior. Los materiales de MEC de recubrimiento pueden ayudar a prevenir la infección (por ejemplo, junto con un agente antimicrobiano de la composición), y/o pueden facilitar el contacto entre el dispositivo médico y el tejido natural del paciente.

En algunas realizaciones, la composición se puede configurar para implantación permanente, no para ser retirada del paciente, y/o puede comprender un recubrimiento de un dispositivo médico configurado para implantación permanente. Similar a lo anterior, los recubrimientos usados para la implantación permanente de un dispositivo médico pueden ayudar a prevenir la infección y/o facilitar el contacto con el tejido natural del paciente.

Las realizaciones de la presente divulgación incluyen identificar un sitio de defecto o herida, por ejemplo, en tejido de mamífero, tal como en un paciente, proporcionar una composición que comprende dos o más materiales de MEC (MEC de bazo en combinación con uno o más de MEC de pulmón, MEC de vesícula biliar, MEC de médula ósea, MEC de páncreas o MEC de hígado), poner en contacto el sitio con una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición, y curar o regenerar el tejido en el sitio. En algunas realizaciones, la composición puede comprender un agente antimicrobiano, tal como plata iónica.

Las composiciones según la presente divulgación pueden incluir uno o más agentes terapéuticos y/o uno o más agentes farmacéuticos. Los tipos y las cantidades de agentes terapéuticos y/o agentes farmacéuticos se pueden elegir basándose en el (los) efecto(s) terapéutico(s) o farmacológico(s) deseados en un paciente que se va a tratar con la composición. Los agentes terapéuticos a modo de ejemplo pueden incluir, pero no se limitan a, agentes de humectación, agentes secantes y agentes calmantes. Los agentes farmacéuticos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, esteroides, hormonas, analgésicos, antiinflamatorios y fármacos de quimioterapia. Los fármacos y agentes terapéuticos se pueden elegir basándose en la aplicación prevista de la composición. Por ejemplo, la composición puede comprender un agente farmacéutico para ayudar a prevenir el estrechamiento (estenosis) de los vasos sanguíneos para aplicaciones vasculares, o para ayudar a prevenir la adherencia de células, por ejemplo, sirviendo de barrera contra adherencias para la reparación de una hernia u otras aplicaciones de reparación de cavidades corporales internas. Las composiciones se pueden usar para la administración de fármacos, para la administración de uno o más agentes farmacéuticos a un sitio o área anatómica específica. Por ejemplo, las composiciones pueden ser adaptadas para disolver, degradar, o ser absorbidas por el cuerpo a una tasa que permite la elución de uno o más agentes farmacéuticos a un tasa controlada o deseada, por ejemplo, para administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz del (de los) agente(s) farmacéutico(s). En algunas realizaciones, la composición puede comprender pequeños "sedimentos" o cilindros densos de MEC administrada con uno o más fármacos de quimioterapia. La composición se puede formular para inyección o para ser quirúrgicamente implantada en un sitio tumoral, de forma que la composición libere el (los) fármaco(s) en el sitio deseado, mientras que se limita o minimiza el traumatismo debido a la exposición a otros tejidos y/o efectos secundarios en todo el sistema corporal.

Lo siguiente describe diversas composiciones a modo de ejemplo, que incluyen diferentes formas y combinaciones de materiales de MEC, y métodos de uso de los mismos. Mientras que algunos de los ejemplos describen combinaciones de tipos específicos de materiales de MEC (por ejemplo, MEC de bazo y de pulmón), otras combinaciones de materiales de MEC son asimismo posibles y están englobadas en el presente documento.

La composición puede comprender uno o más materiales de MEC en forma de hoja, que incluye hojas con textura o estructura particular para promover el crecimiento de tejido, tal como una estructura de tipo malla o de tipo armazón. Por ejemplo, la composición puede incluir una estructura de tipo armazón para promover la restauración de tejido cuando se implanta en el sitio anatómico en un paciente. La composición puede tener una configuración multicapa (por ejemplo, dos o más capas de hoja unidas, reticuladas, o acopladas juntas de otro modo) y/o una configuración

de sándwich (por ejemplo, dos o más hojas que limitan o encierran un material entremedias, o una única hoja plegada sobre sí misma para revestir un material). La composición se puede diseñar para aplicación externa, aplicación interna, o ambas. En algunas realizaciones, las hojas se pueden tratar con un agente antimicrobiano como se trata anteriormente para proveer la composición de propiedades antimicrobianas.

Las Fig. 1 y 2 ilustran composiciones a modo de ejemplo que comprenden materiales en hoja de MEC según la presente divulgación. La Fig. 1 muestra una composición multicapa 10 que comprende capas que tienen diferentes tipos de estructura de tejido. Como se muestra, la composición puede comprender una primera capa 12 de material de MEC que tiene una estructura de tipo hoja, y una segunda capa 14 de material de MEC que tiene tanto estructura de tipo hoja como de tipo matriz fibrosa reticular. En algunas realizaciones, la segunda capa 14 puede comprender solo estructura de tipo matriz. Las dos capas pueden derivar del mismo tipo de tejido (por ejemplo, una capa de tipo hoja y capa de matriz de MEC de bazo acopladas juntos), o diferentes tipos de tejidos (por ejemplo, una capa de tipo hoja de MEC de pulmón acoplada con una capa reticular de MEC de bazo). La composición puede comprender más de dos capas, por ejemplo, capas alternas de hoja-matriz, dos o más capas de tipo hoja, dos o más capas de matriz, etc.

En algunas realizaciones, por ejemplo, la composición puede comprender un injerto de tejido o apósito para heridas (por ejemplo, una venda, parche, almohadilla, compresa, cinta médica, etc.) que incluye una capa de hoja externa de MEC de pulmón y capa de matriz interna de MEC de bazo, combinando así la impermeabilidad a los líquidos externos de la MEC de pulmón con una intrincada red interna de MEC de bazo capaz de acomodar materiales para promover la regeneración celular.

La Fig. 2 muestra una composición 20 a modo de ejemplo que comprende materiales de MEC que tienen tanto estructura de tipo hoja como estructura de matriz. Por ejemplo, los materiales de MEC pueden derivar de tejido del bazo, de forma que durante el proceso de descelularización la red fibrosa o estructura de matriz 24 sigue intacta y se une a la capa de membrana 22 en cualquier lado de la matriz reticular 24. La composición 20 puede comprender un segundo tipo de material de MEC 25 incorporado en los espacios intersticiales dentro de la estructura de matriz reticular 24. Por ejemplo, la composición 20 puede comprender partículas de MEC de pulmón y/o MEC de médula ósea incorporadas dentro de la matriz de bazo reticular, una combinación de partículas de MEC de pulmón y MEC de bazo, una combinación de MEC de pulmón en forma de partículas y en forma de gel, o una combinación de MEC de pulmón en forma de partículas y MEC de bazo en forma de gel.

Las composiciones que comprenden materiales de MEC de tipo hoja (opcionalmente en combinación con otras formas de materiales de MEC) se pueden usar en una variedad de aplicaciones. Por ejemplo, una composición adecuada para tratar quemaduras o lesiones de la piel puede comprender dos o más capas de diferentes materiales de MEC de tipo hoja (por ejemplo, MEC de bazo y MEC de pulmón en forma de hoja), por ejemplo, en donde las hojas pueden ser de malla o no de malla. Se puede añadir plata (por ejemplo, plata elemental o iónica) como recubrimiento o incorporar en las hojas para proporcionar propiedades antimicrobianas.

Además, por ejemplo, la composición puede comprender un parche o injerto vascular que comprende una o más capas internas de MEC de pulmón en forma de hoja, y una o más capas externas de MEC de bazo en forma de hoja. Por ejemplo, la MEC de pulmón puede comprender las 1-3 capas más internas para proporcionar una barrera menos permeable y permitir la migración más rápida de células endoteliales a través de la porción interna del parche/injerto, mientras que también se utiliza la elastina en la MEC de pulmón para una mejor compatibilidad de la conformidad del parche/injerto con la pared natural del vaso sanguíneo. La MEC de bazo puede comprender las 1-3 capas más externas para proporcionar factores de crecimiento adicionales y una capa externa más porosa para permitir la incorporación más rápida del tejido hospedador.

En algunas realizaciones, la composición puede comprender un parche de reparación de duramadre, que comprende una o más capas internas de MEC de pulmón en forma de hoja, y una capa externa de MEC de bazo en forma de partículas o de gel recubierta sobre la hoja. La(s) hoja(s) de MEC de pulmón pueden proporcionar una superficie relativamente lisa y menos porosa adyacente al líquido cefalorraquídeo cerebral, mientras que la partícula o gel de MEC de bazo puede proporcionar más contenido de factor de crecimiento para la señalización.

En algunas realizaciones, la composición puede comprender un parche de reparación de la córnea, que comprende una o más capas de MEC de pulmón (por ejemplo, en forma de hoja delgada) combinadas con partículas de MEC de bazo. El componente de MEC de pulmón puede actuar de parche, mientras que el componente en partículas de MEC de bazo se puede degradar más rápidamente para proporcionar un bolo de factor de crecimiento, u otros componentes de señalización liberados en el sitio de lesión/reparación.

La composición puede comprender un injerto de regeneración ósea guiada (ROG) o injerto de regeneración tisular guiada (RTG). Por ejemplo, la composición puede comprender MEC de pulmón y de bazo en forma de hoja, la MEC de pulmón dispuesta adyacente al hueso para proporcionar una barrera menos permeable que mantiene el espacio para que el hueso crezca, y comprendiendo la MEC de bazo capas externas para proporcionar un armazón de MEC más poroso que permite la penetración más rápida de tejido.

En algunas realizaciones, la composición puede comprender un injerto de reparación de una hernia que comprende múltiples capas de tanto materiales de MEC de pulmón como de bazo en forma de hoja para proporcionar resistencia suficiente para la reparación de una hernia específica. Las hernias inguinales, de hiato y ventrales tienen cada una diferentes requisitos de resistencia debido a los esfuerzos en los sitios anatómicos particulares. Normalmente se requiere más resistencia para un dispositivo de reparación de una hernia ventral que para un dispositivo de reparación de hernia de hiato, por ejemplo. Una cara de la composición puede comprender múltiples capas de material en hoja de MEC de pulmón para proporcionar una superficie menos porosa para minimizar la formación de adherencias, mientras que la cara opuesta puede comprender múltiples capas de material en hojas de MEC de bazo para proporcionar una interfaz más porosa para la rápida penetración de tejido en el injerto. La composición puede comprender plata (por ejemplo, plata elemental o iónica) y/o uno o varios de otros agentes antimicrobianos para proporcionar propiedades antimicrobianas.

En algunas realizaciones, la composición puede tener una forma tubular o de tipo varilla. Por ejemplo, los materiales de MEC de tipo hojas pueden estar enrollados o ser manipulados de otro modo en una configuración tubular o forma de tipo varilla. Las composiciones de MEC tubulares y/o de tipo varilla pueden ser adaptadas para una variedad de aplicaciones anatómicas.

Por ejemplo, la composición puede comprender una guía/injerto nervioso tubular que incluye una o más capas internas de material en hoja de MEC de pulmón y una o más capas externas de material en hoja de MEC de bazo. La superficie más lisa de la porción interna de MEC de pulmón puede proporcionar un conducto adecuado para que crezca junto con el nervio, por ejemplo, mientras que la porción externa de MEC de bazo puede permitir la incorporación del injerto en el tejido circundante. En algunas realizaciones, la composición de MEC tubular puede comprender además uno o más materiales de MEC en el interior de la superficie tubular (por ejemplo, un material en partículas de MEC, gel de MEC o partícula/gel de MEC en combinación), por ejemplo, en donde el material de MEC interior se puede degradar con el tiempo para liberar factores de crecimiento para estimular el crecimiento de tejido, tal como el crecimiento de nuevos nervios. Las aplicaciones a modo de ejemplo de las composiciones de MEC tubulares incluyen, pero no se limitan a, injertos vasculares, dispositivos de acceso vascular, guías nerviosas, reparación del conducto biliar, reparación del uréter, reparación de la uretra y reparación de las trompas de Falopio.

Como se ha mencionado anteriormente, la composición puede comprender material en hojas de MEC enrollado en forma cilíndrica, o retorcido o trenzado en una forma de cadena o de tipo varilla. En algunas realizaciones, la partícula de MEC comprimida, partícula/gel, u otra suspensión, dispersión, o material de MEC fluidizado, se puede poner en un molde y comprimir en una forma de tipo varilla u otra forma tridimensional. El material de MEC de tipo varilla puede incluir uno o varios de otros componentes, tales como componentes bioactivos adicionales, agentes farmacéuticos, otros materiales de MEC, polímeros, hidrogeles, ácido hialurónico, o materiales de aloinjerto. Las aplicaciones a modo de ejemplo para las composiciones de MEC de tipo varilla incluyen, pero no se limitan a, injertos de tejido, aumento de tejido y reconstrucción de tejido.

En algunas realizaciones, la composición puede comprender materiales de MEC en una forma de tipo varilla, por ejemplo, para su uso como un injerto de nervio u otro injerto de tejido. Una composición de tipo varilla o cilíndrica 30 a modo de ejemplo se ilustra en las Fig. 3A-3C. Por ejemplo, la composición 30 puede comprender una o más capas de material de MEC enrollado en una forma, en general, cilíndrica, como se muestra en la Fig. 3A. Las Fig. 3B y 3C muestran secciones transversales de diferentes posibles configuraciones de la composición 30.

En algunas realizaciones, por ejemplo, la MEC de bazo en forma de hoja puede estar enrollada en un cilindro, con MEC de pulmón en forma de hoja que forma una o más capas externas que rodean la MEC de bazo. Esta configuración se ilustra en la Fig. 3B, que muestra una o más capas externas 32 de MEC de pulmón de tipo hoja, y una o más capas internas 34 de MEC de bazo reticular. En algunas realizaciones, la composición 30 puede comprender MEC de bazo dentro con MEC de pulmón fuera enrollada o trenzada en una forma de tipo varilla también. La porción más porosa de MEC de bazo en el interior de la composición 30 puede proporcionar una rápida penetración de tejido a través del centro del injerto. La MEC de pulmón menos porosa en el exterior puede proporcionar la rápida migración de células a través de la superficie del injerto, mientras que también previene la adherencia a tejido natural y/o la penetración de tejido en el hueco del nervio que se regenera dentro del interior. La Fig. 3C muestra una sección transversal de otra configuración a modo de ejemplo de la composición 30, que comprende una o más capas externas 36 de material de MEC de tipo hoja (por ejemplo, MEC de pulmón de tipo hoja), y una o más capas internas 38 de material de MEC reticular (por ejemplo, MEC de bazo reticular). En algunas realizaciones, se puede incorporar tejido de nervio de aloinjerto en la composición 30, por ejemplo, como parte de una cadena externa retorcida o trenzada, o como el centro de un injerto de nervio en forma de varilla cilíndrica enrollada.

Las composiciones de tipo varilla también se pueden usar en el aumento de tejido, por ejemplo, durante la cirugía plástica o cirugía reconstructiva. Por ejemplo, la composición se puede usar en la labioplastia de aumento. La MEC de pulmón se puede usar como las capas interiores de una composición en forma de varilla para formar un núcleo menos compresible de la varilla, lo que permite que mantenga su forma y volumen, mientras que la MEC de bazo se puede usar en el exterior, de manera que la superficie de MEC de bazo más porosa está orientada hacia el exterior. La MEC de bazo poroso puede permitir la rápida integración de tejido en el injerto, dando como resultado menos

migración del injerto y curación más rápida.

Además, por ejemplo, la composición puede tener una forma cilíndrica o de tipo varilla usada para la reconstrucción del pezón. Dependiendo del procedimiento quirúrgico usado, la composición se puede construir con MEC de pulmón en el interior para proporcionar un núcleo menos poroso, y MEC de bazo en el exterior para proporcionar una superficie más porosa que se puede integrar con el tejido del hospedador para mantener el injerto en su sitio y mantener una forma que sobresale. En algunas realizaciones, la composición puede comprender MEC de bazo en el interior, por ejemplo, para la integración de tejido en el centro de la composición para proporcionar estabilidad, y MEC de pulmón en el exterior, por ejemplo, para proporcionar menos invasión del tejido hospedador y preservar mejor la forma y el volumen de la protuberancia. En algunas realizaciones, la composición puede comprender una cadena retorcida o trenzada de tanto la MEC de pulmón como la MEC de bazo.

En algunas realizaciones, el material de MEC de tipo varilla se puede usar como injerto de tendón o de ligamento. Por ejemplo, la composición puede comprender MEC de bazo y MEC de pulmón en cantidad diferente, tal como una relación bazo:pulmón de aproximadamente 70:30, 80:20 o 90:10, en donde la MEC de bazo comprende las capas internas y la MEC de pulmón comprende las capas externas. Como se ha mencionado anteriormente, la MEC de pulmón tiene, en general, un mayor contenido de elastina y estira más una MEC de bazo. Un injerto de tendón o ligamento requiere normalmente un estiramiento mínimo para prevenir que la unión "se afloje" con el tiempo debido al estiramiento del tendón o del ligamento después de la implantación del injerto. Sin embargo, durante la curación, los injertos de MEC se encogen frecuentemente ligeramente. Por lo tanto, puede desearse una cantidad de estiramiento, por ejemplo, incorporando MEC de pulmón dentro de las capas externas del injerto. La cantidad de MEC de pulmón incorporada en el injerto se puede ajustar para lograr el grado de estiramiento deseado. En algunas realizaciones, la composición de injerto puede comprender tendón o ligamento de aloinjerto. La incorporación de materiales de MEC, por ejemplo, en forma de hoja, partícula y/o gel, en la composición de injerto de tendón o ligamento puede proporcionar un armazón adicional y componentes de señalización para la incorporación del tendón/ligamento en el tejido hospedador y para la migración y proliferación celular en el material de injerto compuesto.

La composición puede comprender una forma, de tipo varilla compresible o expansible, por ejemplo, para implantación como un dispositivo médico, por ejemplo, para la reparación de un sitio de acceso vascular. Normalmente, se aplica compresión a sitios de acceso vascular para prevenir el sangrado y cerrar el sitio. Una composición de tipo varilla o cilíndrica que comprende MEC de bazo y de pulmón (y/u otros tipos de materiales de MEC) se puede insertar en el sitio de acceso, por ejemplo, para llenar y/o sellar una incisión en un vaso sanguíneo y detener el sangrado, mientras que también proporciona un armazón y componentes de señalización biológica para curar la incisión en el vaso sanguíneo. Por ejemplo, la composición puede comprender un cilindro enrollado con una o más capas internas de MEC de pulmón (por ejemplo, hojas enrolladas de MEC de pulmón) para proporcionar un núcleo menos compresible o no compresible, y una o más capas externas que comprenden MEC de bazo más porosa en forma de hoja. La composición se puede comprimir en una forma cilíndrica configurada para ser expandida cuando se humedece con sangre en el sitio, lo que sella así la incisión. Además, por ejemplo, la MEC de pulmón y de bazo en forma de gel se puede secar y/o reticular en una forma cilíndrica, humedecer, comprimir y secar nuevamente para producir una esponja expansible que tiene, en general, una forma cilíndrica o de tipo varilla.

En algunas realizaciones, la composición puede comprender un dispositivo médico que incluye una o más características configuradas para anclar el dispositivo tras la implantación en el cuerpo, por ejemplo, como un tapón para fístula. Por ejemplo, los defectos de fístula de alto gasto pueden causar que los tapones para fístula u otros materiales/dispositivos se desplacen del defecto. Para tratar este problema, el dispositivo puede comprender una combinación de materiales de MEC de bazo y de pulmón en una porción de cuerpo cilíndrico o en forma de varilla con protuberancias a lo largo de la longitud del cuerpo cilíndrico/ en forma de varilla para anclar el dispositivo contra las paredes de la fístula y prevenir que el dispositivo se desplace. Este anclaje también puede proporcionar una aproximación del tejido para permitir la penetración de tejido en los materiales de MEC (por ejemplo, matriz de MEC) por la estructura de armazón y los componentes de señalización biológica.

En algunas realizaciones, por ejemplo, el dispositivo puede tener una forma de "paraguas" formada por brazos expansibles en uno o ambos extremos del dispositivo. Cuando se inserta en la fístula y se despliega, el extremo en "paraguas" se puede abrir en un disco o forma similar acoplada con la porción de cuerpo cilíndrico/en forma de varilla para sellar un extremo de la fístula y anclar el dispositivo, por ejemplo, para la reparación de un defecto. Esta configuración se ilustra en las Fig. 4A y 4B, que muestran un dispositivo médico 40 configurado para el anclaje tras la implantación en una fístula u otro conducto dentro del cuerpo. El dispositivo 40 puede incluir una porción de cuerpo 41 y al menos una porción de anclaje 43. Por ejemplo, la porción de cuerpo 41 puede comprender una composición según la Fig. 3A, por ejemplo, que comprende capas internas y externas de diferentes materiales de MEC, o cualquier otra combinación de materiales de MEC como se describe en el presente documento. La porción de anclaje 43 puede comprender un conjunto de brazos expansibles 45 en lados opuestos de la porción de cuerpo 41. En algunas realizaciones, el dispositivo 40 puede comprender más de una porción de anclaje 43.

Cada una de la porción de cuerpo 41 y la porción de anclaje 43 puede comprender uno o más materiales de MEC y/o uno o más materiales no de MEC. Los materiales no de MEC pueden incluir, pero no se limitan a, metales

biocompatibles, aleaciones metálicas, cerámicos, polímeros, o combinaciones de los mismos. Los polímeros adecuados incluyen, pero no se limitan a, ácido poliláctico (PLA), poliglicolida (PGA) y poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA). La porción de cuerpo 41 puede comprender los mismos materiales o diferentes como porción de anclaje 43. Por ejemplo, la porción de cuerpo 41 puede comprender una combinación de dos o más materiales de MEC diferentes, y la porción de anclaje 43 puede comprender al menos un material no de MEC, tal como un polímero o combinación de polímeros. En algunas realizaciones, la porción de cuerpo 41 y la porción de anclaje 43 pueden ambas comprender al menos dos materiales de MEC diferentes. Cualquiera de los materiales de MEC, combinaciones de materiales de MEC y materiales no de MEC (incluyendo agentes antimicrobianos) como se trata anteriormente se puede usar para el dispositivo médico 40.

Cuando el dispositivo 40 está en una configuración comprimida, como se muestra en la Fig. 4A, los brazos 45 se pueden extender sustancialmente a lo largo de la porción de cuerpo 41 para facilitar la inserción en una fístula 100 u otro pasadizo dentro del cuerpo del paciente. Los brazos 45 se pueden configurar para extenderse alejados de la porción de cuerpo 41 por autoexpansión una vez que ya no está restringida por las paredes de la fístula 100. Una vez expandidos, como se muestra en la Fig. 4B, los brazos 45 pueden anclar el dispositivo 40 dentro de la fístula 100.

Además, por ejemplo, la composición puede comprender un dispositivo médico con una porción de cuerpo cilíndrico o de tipo varilla que incluye pestañas, "alas" o bordes que sobresalen a lo largo de al menos una porción de la longitud del cuerpo. Las Fig. 5A y 5B ilustran un dispositivo médico 50 a modo de ejemplo que incluye una porción de cuerpo 51 y una o más protuberancias 55 a lo largo de la longitud de la porción de cuerpo 51. La porción de cuerpo 51 puede comprender dos o más tipos diferentes de materiales de MEC, tal como la composición 30 de la Fig. 3A, o cualquier otra combinación de materiales de MEC y materiales no de MEC como se describe en el presente documento, que incluye los materiales tratados anteriormente en relación con el dispositivo médico 40. Las protuberancias 55 puede estar inclinadas en una dirección proximal (es decir, lejos de la dirección de inserción), de forma que el dispositivo 50 pueda ser avanzado dentro de la fístula 100 pero no sacado, debido a las protuberancias 55 que atrapan el tejido a lo largo de la pared de la fístula 100. En algunas realizaciones, las protuberancias 55 pueden tener una punta punzante o barbada para anclar aún más el dispositivo 50 dentro de la fístula 100.

Inhalación

En algunas realizaciones, la composición puede comprender materiales de MEC en forma de partículas, por ejemplo, para administración por inhalación. Las partículas pueden variar desde aproximadamente 100 nm hasta aproximadamente 5 µm de diámetro, tal como desde aproximadamente 1 µm hasta aproximadamente 5 µm de diámetro, o desde aproximadamente 100 nm hasta aproximadamente 2,5 µm de diámetro. En algunas realizaciones, por ejemplo, la composición puede comprender partículas que tienen sustancialmente el mismo tamaño, por ejemplo, un diámetro de partículas de aproximadamente 100 nm, aproximadamente 300 nm, aproximadamente 500 nm, aproximadamente 1 µm, aproximadamente 2,5 µm, o aproximadamente 5 µm. En algunas realizaciones, la composición puede comprender partículas que tienen una distribución de tamaños con un diámetro promedio o mediana del diámetro que varía desde aproximadamente 300 nm hasta aproximadamente 5 µm, por ejemplo, aproximadamente 300 nm, aproximadamente 500 nm, aproximadamente 1 µm, aproximadamente 2,5 µm, o aproximadamente 5 µm. La distribución de tamaños puede ser unimodal o bimodal.

La composición puede comprender dos o más materiales de MEC en forma de partículas. Por ejemplo, la composición puede comprender un primer conjunto de partículas de un primer material de MEC y un segundo conjunto de partículas de un segundo material de MEC, en donde el primer y el segundo conjuntos de partículas pueden tener los mismos diámetros o distribuciones de tamaños o diferentes. En algunas realizaciones, la composición puede comprender partículas de MEC de pulmón y de bazo que varían desde aproximadamente 1 µm hasta aproximadamente 5 µm de diámetro para la administración a los pulmones de un paciente por inhalación.

La composición en partículas se puede usar para tratar el aparato respiratorio, para tratar un trastorno respiratorio, y/o para administrar un agente farmacéutico, tal como un esteroide para captación por el aparato respiratorio. En algunas realizaciones, por ejemplo, la composición se puede usar para tratar asma, infecciones pulmonares o una lesión pulmonar, tal como daño a los pulmones por inhalación de gases nocivos, humo o agentes químicos o biológicos. La composición puede ser inhalada después de la exposición a toxinas y sustancias perjudiciales para ayudar en la curación de tejido dañado en los pulmones, y para minimizar y/o prevenir fibrosis pulmonar. En algunas realizaciones, la composición se puede administrar para mitigar los efectos de enfermedades que causan un daño a los pulmones, por ejemplo, como parte de una pauta posológica rutinaria.

En algunas realizaciones, la composición puede servir de vehículo de administración de un fármaco o agente terapéutico. Por ejemplo, el fármaco o agente terapéutico se puede incorporar en el material de MEC durante el procesamiento de forma que el agente se asocie con las partículas, tales como un recubrimiento. En al menos una realización, la composición puede comprender al menos un material de MEC en combinación con propionato de fluticasona y salmeterol, opcionalmente en combinación con un agente farmacéutico, tal como un esteroide, formulado para administración por inhalación.

Inyección

La composición se puede formular para inyección, por ejemplo, en forma líquida o de gel. Las partículas de MEC, geles y/o las combinaciones de partículas y de gel, se pueden usar como inyectable para una variedad de aplicaciones, que incluyen, pero no se limitan a, artritis (por ejemplo, inyecciones en las articulaciones para tratar artritis), desgarros parciales de tendones/ligamentos, desgarro o daño del cartílago, desgarros o daño nervioso, regeneración de la vaina de mielina, restauración capilar y en cirugía plástica y reconstructiva (por ejemplo, como una carga vacía o agente de carga). Como se ha mencionado anteriormente, los geles de MEC se pueden producir por digestión (por ejemplo, por enzimas digestivas) o procesamiento químico de materiales de MEC en forma de gel, que se puede combinar con partículas de MEC u otros materiales de MEC adicionales.

En algunas realizaciones, la composición puede comprender una relación 50-50 entre MEC de pulmón en partículas y MEC de bazo en partículas suspensas dentro de un gel de MEC como vehículo (por ejemplo, un gel de MEC de pulmón, gel de MEC de bazo o gel de MEC de mezcla de pulmón/bazo). La composición de pulmón/bazo se puede inyectar en uno o más sitios a lo largo de un nervio que se ha dañado o pérdida sostenida de la vaina de mielina, tal como en la enfermedad de esclerosis lateral amiotrófica (ELA) o esclerosis múltiple. Sin desear quedar ligado a teoría, se cree que los factores de crecimiento y otros componentes de señalización dentro de la composición de MEC pueden señalar células madre mesenquimatosas para que migren al sitio de inyección e induzcan la formación de vaina de mielina nueva o tejido nervioso.

Construcciones tridimensionales

En algunas realizaciones, la composición puede comprender materiales de MEC formados en una construcción tridimensional, por ejemplo, para rellenar o reparar defectos grandes, o en la reconstrucción específica de paciente de tejido perdido o dañado. Dichas construcciones pueden ser útiles en cirugía reconstructiva, en donde puede haber una necesidad de llenar un hueco, o de regenerar tejido en un área específica, por ejemplo, que tiene una forma particular.

En algunas realizaciones, por ejemplo, las construcciones de MEC pueden tener formas tridimensionales obtenidas por formas o moldes especializados, o cortando, recortando o manipulando de otro modo formas normalizadas más grandes, tales como bloques o varillas en la forma deseada, por ejemplo, para hacer coincidir el tamaño y la forma del hueco o defecto a llenar. La construcción puede variar en la composición, por ejemplo, comprendiendo un material compuesto dos o más materiales de MEC, y puede variar en la porosidad. La construcción puede comprender uno o más componentes no de MEC, que incluyen, pero no se limitan a, células, agentes farmacéuticos, polímeros o hueso desmineralizado.

En algunas realizaciones, se puede usar técnicas de escaneado, de obtención de imágenes y/o modelado informático 3D para preparar una réplica del hueco/defecto u obtener de otro modo las dimensiones de la construcción de MEC necesaria para la reparación. De esta forma, se puede preparar una construcción tridimensional según las dimensiones exactas necesarias para un paciente dado. El molde se puede llenar con diferentes tipos de materiales de MEC y materiales no de MEC para obtener un implante específico del paciente.

Por ejemplo, un paciente con cáncer de boca puede requerir intervención quirúrgica para retirar hueso y tejido blando en el sitio del cáncer. Para la reparación del área afectada después de la cirugía, por ejemplo, por implantación de tejido de sustitución o un injerto de tejido, se puede diseñar un molde obteniéndose imágenes del sitio retirado. Se puede añadir una combinación de MEC de pulmón y MEC de bazo en forma en partículas y de gel al molde, por ejemplo, para que comprenda la porción de tejido blando, junto con hueso desmineralizado, por ejemplo, para que comprenda la mandíbula de sustitución.

Combinaciones adicionales de materiales de MEC pueden incluir hojas de MEC combinadas con uno o varios de otros materiales de MEC en forma en partículas, gel, espuma y/o esponja para crear construcciones "de tipo hoja" con densidades y compresibilidad variables. Las construcciones pueden ser adaptadas para aplicaciones específicas, que incluyen, pero no se limitan a, injertos de reparación de cartílago e injertos de disco espinal. En algunas realizaciones, por ejemplo, la composición puede comprender hojas circulares de materiales de MEC de pulmón y/o bazo con otras formas de materiales de MEC (por ejemplo, en forma en partícula, gel, partícula más gel, espuma o esponja, o materiales similares) que proporcionan una porción circular interna que es más compresible que el "anillo" externo del material de MEC de pulmón/bazo. Esta configuración puede simular el anillo sobre el exterior (por ejemplo, el anillo fibroso) y el núcleo sobre el interior (por ejemplo, el núcleo pulposo). En algunas realizaciones, la composición puede ser un dispositivo de hemostasia que comprende una capa externa de MEC de pulmón (por ejemplo, para proporcionar impermeabilidad a los líquidos), una capa interna de MEC de bazo (por ejemplo, procesada para mantener la arquitectura única de la estructura reticular de MEC de bazo) y un recubrimiento de mezcla de partículas de MEC de pulmón/bazo incorporada en la capa interna de MEC de bazo. La relación de la partícula puede ser aproximadamente 50:50 pulmón-bazo.

Además, la composición se puede usar como un material de injerto de hueso. Por ejemplo, la composición puede comprender una mezcla de partículas de dos o más materiales de MEC (por ejemplo, MEC de bazo y de pulmón) en

diversas relaciones, o una mezcla de un material de MEC en forma de partículas y un material de MEC en forma de gel (por ejemplo, partícula de MEC de bazo y gel de MEC de pulmón, o partícula de MEC de pulmón y gel de MEC de bazo). La composición puede incluir cada vez más agentes o materiales adicionales tales como, por ejemplo, trifosfato de calcio, hidroxiapatita, vidrio bioactivo, hueso mineralizado, hueso desmineralizado, u otro componente mineral. En algunas realizaciones, la composición puede incluir uno o más agentes antimicrobianos, tales como, por ejemplo, plata iónica o plata elemental, para su uso en aplicaciones de curación de infección ósea.

Los materiales de MEC se pueden combinar o incorporar entre sí y/o combinar con materiales no de MEC por cualquier método adecuado, y pueden ser físicamente unidos y/o químicamente unidos juntos. Por ejemplo, se puede usar un adhesivo, tal como pegamento de fibrina, cianoacrilato, trombina/gelatina, polietilenglicol (PEG), o una soldadura, tal como albúmina (por ejemplo, aplicada con energía laser o calor para soldar juntos los tejidos), para incorporar materiales de MEC entre sí. Además, se pueden usar agentes de reticulación, tales como, por ejemplo, glutaraldehído, dendrímeros o azul de metileno, para formar enlaces entre diferentes materiales de MEC. Adicionalmente o alternativamente, los materiales de MEC se pueden combinar en una composición por energía térmica, luz ultravioleta y/o reticulación química. Por ejemplo, las moléculas basadas en azúcar, tales como un sacárido (por ejemplo, glucosa o galactosa) o un disacárido (por ejemplo, lactosa o sacarosa) y/o moléculas basadas en péptidos, se pueden usar para combinar diferentes materiales de MEC. En algunas realizaciones, los diferentes materiales de MEC se pueden combinar en una forma de construcción tridimensional exponiendo los materiales al calor (por ejemplo, una temperatura que varía desde aproximadamente 50 °C hasta 250 °C), mientras se comprimen o están en estrecha proximidad entre sí. El calor puede generar enlaces (reticulaciones) entre colágenos en los diferentes materiales de MEC.

En algunas realizaciones, la composición se puede preparar combinando un material de MEC en forma de gel con un material de MEC en forma de partículas, por ejemplo, para producir una oblea o torta en partículas. Por ejemplo, el gel de MEC se puede introducir en un molde con la partícula de MEC, comprimir y/o reticular juntos, y secar en un molde para formar la composición en una oblea o torta en partículas. En algunas realizaciones, el gel de MEC se puede introducir en un molde sin partícula de MEC, y comprimir y/o reticular para formar la composición.

Las composiciones según la presente divulgación se puede preparar mezclando diferentes materiales de MEC juntos en forma de partículas. Las partículas de MEC se pueden preparar por picado, corte, pulverización, molienda o trituración del material de MEC con un dispositivo adecuado, tal como una mezcladora, un molino de martillos, un molino de cuchillas, un molino centrífugo o una trituradora de rodillos, por ejemplo, para formar partículas. En algunas realizaciones, dos o más materiales de MEC en forma de partículas se pueden mezclar juntos en un gel (por ejemplo, un material de MEC en forma de gel, que puede ser el mismo tipo o diferente de material de MEC como las partículas de MEC) o un vehículo líquido. Los ejemplos de vehículos adecuados incluyen, pero no se limitan a, ácido hialurónico, gelatina, lecitina, gel de colágeno y solución salina.

Además, las composiciones según la presente divulgación se pueden preparar recubriendo un tipo de material de MEC sobre un tipo diferente de material de MEC. Por ejemplo, un primer material de MEC (por ejemplo, un núcleo de MEC) se puede recubrir con un segundo material de MEC (por ejemplo, un recubrimiento de MEC). Por ejemplo, la composición puede comprender partículas de MEC que tienen un núcleo de un tipo de material de MEC y un recubrimiento de un tipo de material diferente de MEC. El recubrimiento del núcleo de MEC se puede realizar, por ejemplo, precipitando el segundo material de MEC sobre el primer material de MEC de una disolución, por una recubridora de rodillo, o por una granuladora. El segundo material de MEC usado como recubrimiento puede estar en forma de líquido o de gel. Otros materiales adecuados para el recubrimiento de materiales de MEC pueden incluir, pero no se limitan a, PLGA, ácido hialurónico, colágeno, o una mezcla de los mismos.

En algunas realizaciones, la composición puede comprender materiales de MEC en forma de gel, en donde el gel puede cambiar en respuesta a un estímulo. Por ejemplo, el gel se puede expandir *in vivo* cuando se inyecta en un sitio diana y/o puede polimerizar *in vivo,* y así puede permanecer fijado en posición cuando polimeriza. El estímulo puede ser, por ejemplo, un cambio en la temperatura y/o el pH. En algunas realizaciones, por ejemplo, el gel puede comprender dos o más materiales de MEC diferentes y al menos un polímero sensible a la temperatura, copolímero o copolímero de bloque. Por ejemplo, el gel puede polimerizar después de un cambio en el pH, en donde el pH se puede alterar añadiendo un ácido o base de forma que el gel polimerice *in vivo* en el sitio de aplicación. En algunas realizaciones, el gel se puede diseñar para polimerizar al pH corporal después de la aplicación al sitio deseado. Se pueden administrar diferentes materiales de MEC al sitio diana simultáneamente en forma de gel, en disolución, o como partículas suspensas en un vehículo, de forma que una vez los materiales de MEC se mezclen juntos en el sitio diana, polimericen y/o se expandan.

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar la presente divulgación sin, sin embargo, ser limitantes de la naturaleza. Se entiende que la presente divulgación engloba realizaciones adicionales de acuerdo con la siguiente descripción y siguiente ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Se extrajeron muestras de tejidos porcinos para medir el contenido de factor de crecimiento. Se extrajo material de matriz micronizada secada muestreado de tejidos de estómago, bazo y de pulmón de cerdo durante 72 horas a 4 °C. Se usaron tres tampones diferentes en las extracciones: solución salina tamponada con fosfato (PBS), tampón RIPA y ácido acético (AA) 0,5 M. Cada extracción incluyó una relación 20:1 entre el volumen de extracción y el peso de tejido (6,0 ml de tampón de extracción por cada 300 mg de material de matriz). Los extractos se analizaron para VEGF-A, EGF, bFGF, PDGF, IGF1 y TGFβ por ELISA usando el manual de instrucciones de ELISA individual. Para ensayar las muestras extraídas con ácido acético usando ELISA, se neutralizaron extractos de ácido acético añadiendo 219 µl de base Tris 2,5 M por cada 1,0 ml de extracto de ácido acético. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Concentraciones de factor de crecimiento (ng/ml) medidas en tejidos de estómago, bazo y pulmón porcino.

	Estómago			Bazo			Pulmón		
Extracción	**PBS**	**RIPA**	**AA**	**PBS**	**RIPA**	**AA**	**PBS**	**RIPA**	**AA**
VEGF	435,8 ± 18,6	314,7 ± 8,7	523,7 ± 78,9	411,1 ± 7,3	328 ± 19,4	437,2 ± 62,4	190,1 ± 10,9	157,8 ± 6,1	569,6 ± 136,8
EGF	177,1 ± 117,8	96,3 ± 36,6	112,2 ± 38,2	260,4 ±31,6	249,2 ± 31,7	206,8 ± 24,5	252,7 ± 78,2	178,1 ± 38,2	174,6 ± 51,2
bFGF	*	*	28,7	*	*	50,1	*	*	54,0
PDGF	303,1	*	168,8	324,5	*	318,6	303,2	*	245,3
IGF1	*	3,1	20,8	3,1	11	79,6	1,7	6,4	141,7
* no detectado									

Se pretende que la memoria descriptiva y los ejemplos se consideren a modo de ejemplo solo, siendo el alcance y espíritu verdadero de la presente divulgación indicado por las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:

un primer material de matriz extracelular derivado de tejido del bazo; y
un segundo material de matriz extracelular derivado de al menos un tejido de mamífero elegido de tejido de pulmón, tejido de la vesícula biliar, tejido de la médula ósea, tejido pancreático o tejido de hígado, estando integrado el segundo material de matriz extracelular al menos parcialmente en el primer material de matriz extracelular;
en donde el primer material de matriz extracelular tiene una concentración de al menos un factor de crecimiento que es superior a una concentración del al menos un factor de crecimiento del segundo material de matriz extracelular, y el segundo material de matriz extracelular tiene una mayor concentración de elastina que el primer material de matriz extracelular, en donde al menos una porción de la composición está en forma de partículas; y
en donde la composición está configurada para administración a un paciente.

2. La composición de la reivindicación 1, en donde el segundo material de matriz extracelular está en forma de partículas.

3. La composición de la reivindicación 2, en donde el primer material de matriz extracelular está en forma de partículas.

4. La composición de la reivindicación 1, en donde el segundo material de matriz extracelular deriva de tejido de pulmón.

5. La composición de la reivindicación 1, en donde uno del primer material de matriz extracelular o el segundo material de matriz extracelular está en forma de partículas, y el otro de la primera matriz extracelular y la segunda matriz extracelular está en forma de gel.

6. La composición de la reivindicación 1, en donde uno del primer material de matriz extracelular o el segundo material de matriz extracelular está en forma de partículas, y el otro del primer material de matriz extracelular o el segundo material de matriz extracelular está en forma de hoja, y en donde la composición está configurada para aplicación al tejido natural del paciente para la reparación del tejido natural.

7. La composición de la reivindicación 6, en donde la composición tiene una forma de tipo varilla.

8. La composición de la reivindicación 6, en donde la composición tiene una forma tubular.

9. La composición de la reivindicación 1, en donde al menos una porción del segundo material de matriz extracelular está en forma de partículas de forma que el segundo material en partículas de la matriz extracelular se incorpore en el primer material de matriz extracelular, y en donde el segundo material de matriz extracelular deriva de tejido de pulmón.

10. La composición de la reivindicación 9, en donde la composición incluye al menos dos capas, comprendiendo al menos una de las capas el segundo material en partículas de la matriz extracelular integrado en el primer material de matriz extracelular.

11. La composición de la reivindicación 1, que comprende además al menos un agente antimicrobiano.

12. La composición de la reivindicación 1, en donde el al menos un agente antimicrobiano comprende plata iónica.

13. La composición de la reivindicación 1, en donde el al menos un factor de crecimiento se elige de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) o factor de crecimiento epidérmico (EGF).

14. La composición de la reivindicación 1, en donde la segunda matriz extracelular comprende matriz extracelular de pulmón, y la matriz extracelular de bazo y la matriz extracelular de pulmón están presentes en la composición en una relación 50-50.

15. La composición de la reivindicación 1, en donde el primer material de matriz extracelular tiene una mayor concentración de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) que el segundo material de matriz extracelular.

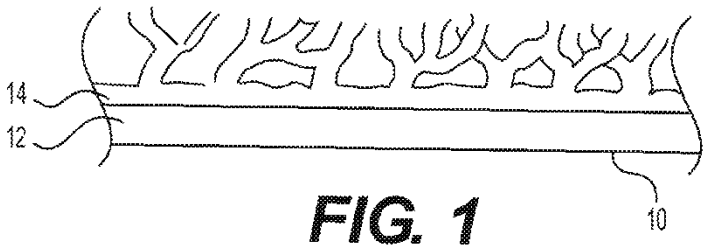


FIG. 1

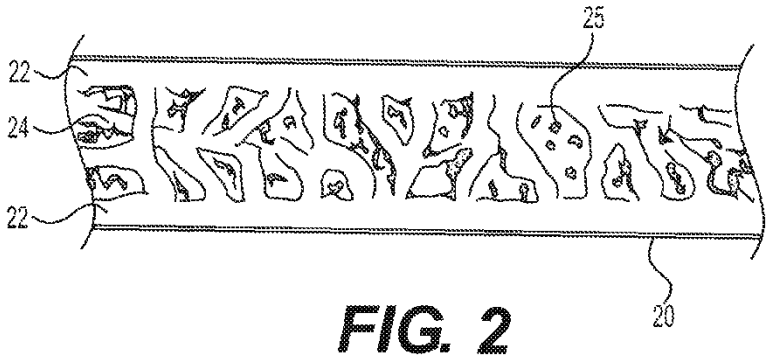


FIG. 2

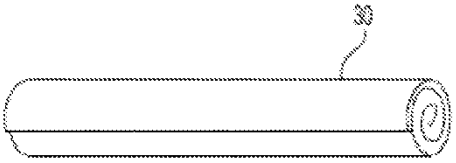


FIG. 3A

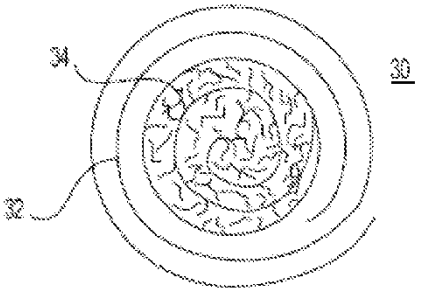


FIG. 3B

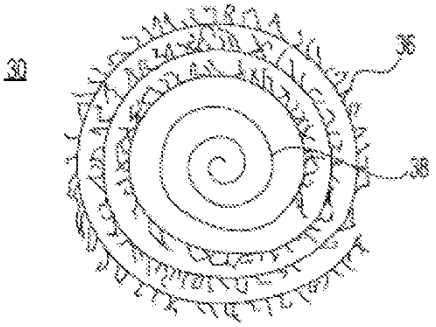


FIG. 3C

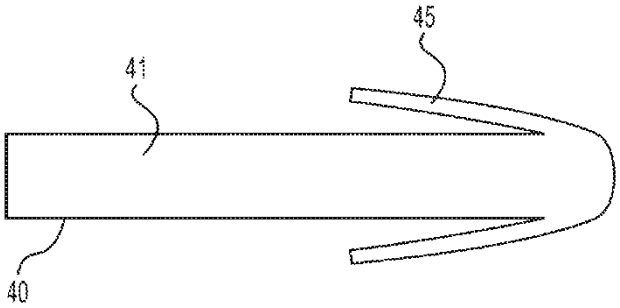


FIG. 4A

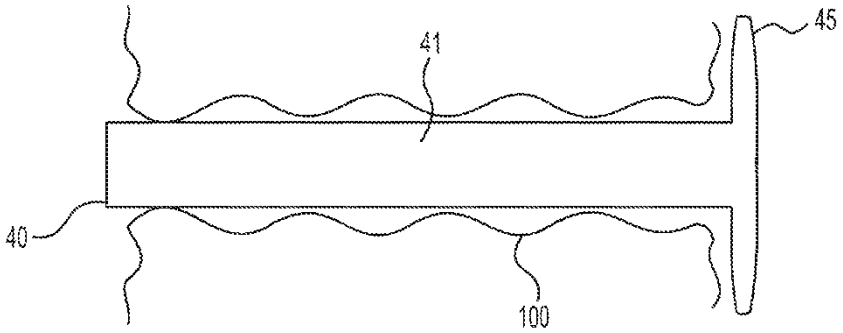


FIG. 4B

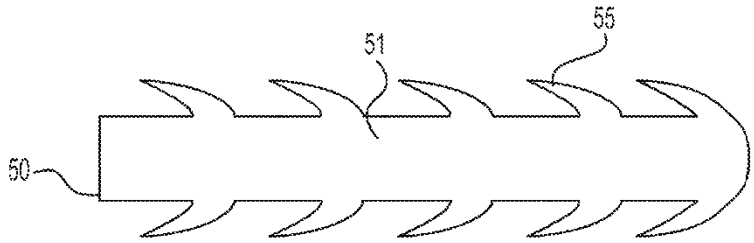


FIG. 5A

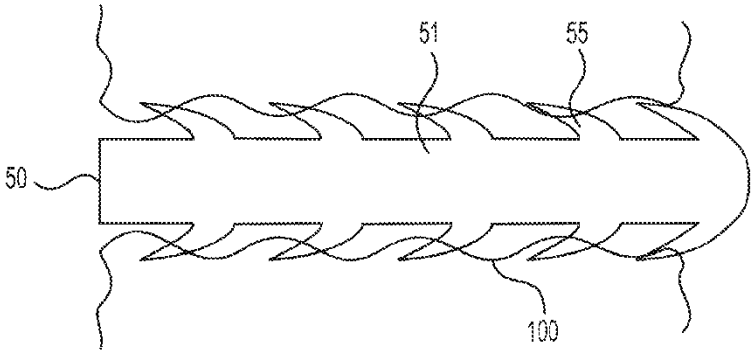


FIG. 5B