

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 836 892**

51 Int. Cl.:

A61L 27/36 (2006.01)

A61K 35/34 (2015.01)

A61F 2/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2013 E 19158081 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2020 EP 3520828**

54 Título: **Matriz muscular descelularizada**

30 Prioridad:

06.07.2012 US 201261668584 P

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

28.06.2021

73 Titular/es:

LIFECCELL CORPORATION (100.0%)

5 Giralda Farms

Madison, New Jersey 07940, US

72 Inventor/es:

XU, HUI;

WAN, HUA y

LIAO, I-CHIEN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 836 892 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Matriz muscular descelularizada

5 La presente descripción se refiere, generalmente, a métodos para elaborar y utilizar matrices musculares descelularizadas en la reparación, regeneración y/o tratamiento de la pared abdominal y otros defectos musculares.

10 Diversas lesiones, enfermedades y procedimientos quirúrgicos dan lugar a la pérdida de masa muscular, especialmente del músculo esquelético. Por ejemplo, la retirada quirúrgica de sarcomas de tejido blando y osteosarcomas puede dar lugar a la pérdida de volumen muscular. Otros procedimientos quirúrgicos y cosméticos, tales como la reparación de hernias y aumento muscular, requieren un control a largo plazo del contenido muscular. El daño muscular también puede ser debido a una lesión, tal como trauma ocasionado por fuerza brusca y heridas de bala.

15 Los procedimientos de regeneración muscular actuales se centran en el uso de aloinjertos musculares (p. ej., obtención de músculo glúteo mayor de sitios donantes del paciente o de un cadáver), y el uso de xenoinjertos que comprenden matrices de tejido dérmico o de otro tipo de tejido completamente descelularizado. Sin embargo, el uso de trasplantes musculares puede dar lugar a un exceso de inflamación (dando lugar a la formación de tejido cicatrizal y posibles rechazos) y, si se obtienen del paciente, presenta el problema de pérdida muscular en el sitio donante. De la misma manera, las matrices totalmente descelularizadas pueden perder resistencia a lo largo del tiempo y son más eficaces para la reparación de fascia que para el músculo suprayacente. Por lo tanto, se continúan necesitando composiciones y métodos mejorados para el control a largo plazo de la reparación y regeneración muscular. Stern M. M. y col. describen un método de obtención de un extracto de músculo esquelético.

25 La invención está definida por las reivindicaciones. Por tanto, en la presente descripción se describen implantes musculares que comprenden matrices musculares descelularizadas que mantienen al menos parte de las miofibras presentes normalmente en un tejido muscular antes del procesamiento, y su uso para mejorar la reparación, tratamiento, refuerzo, y/o regeneración muscular. En diversas realizaciones se proporciona un método de preparación de un implante muscular que comprende proporcionar al menos una muestra de músculo; poner en contacto la al menos una muestra de músculo con una solución de tripsina; descelularizar la al menos una muestra de músculo para producir al menos una matriz muscular descelularizada; y controlar la duración de la exposición y/o la concentración de la solución de tripsina para conservar al menos parte de las miofibras presentes normalmente en la muestra de músculo antes de la descelularización. En algunas realizaciones, la solución de descelularización comprende al menos uno de TRITON X-100™, dodecilsulfato sódico, desoxicolato sódico, y monolaurato de polioxietileno (20) sorbitán. En algunas realizaciones, la matriz muscular descelularizada conserva aproximadamente 35 20-80 % de las miofibras presentes normalmente en el tejido muscular antes del procesamiento. En determinadas realizaciones, el método además comprende unir la al menos una matriz muscular descelularizada a al menos una matriz dérmica descelularizada. En algunas realizaciones, el método además comprende la mezcla, corte, homogeneización, o criofractura del implante muscular para formar un implante muscular en forma de partículas. En algunas realizaciones, el implante muscular se expone a radiación de haz de electrones.

40 En diversas realizaciones, se proporciona un implante muscular, que comprende al menos una matriz muscular descelularizada que contiene al menos parte de las miofibras presentes normalmente en un tejido muscular antes del procesamiento. En algunas realizaciones, la matriz muscular descelularizada contiene 20-80 % de las miofibras presentes normalmente en el tejido muscular antes del procesamiento. En algunas realizaciones, el implante muscular además comprende al menos una matriz dérmica descelularizada unida a la al menos una matriz muscular descelularizada. En determinadas realizaciones, el implante muscular está en forma de partículas. En determinadas realizaciones, el implante muscular está liofilizado o se proporciona en solución acuosa.

50 En diversas realizaciones, se proporciona un implante muscular para usar en un método de tratamiento, que comprende implantar en un paciente uno de los implantes musculares arriba descritos. En algunas realizaciones, el implante muscular favorece una mayor velocidad y/o cantidad global de regeneración de músculo natural tras la implantación en un paciente, en comparación con la velocidad y/o la cantidad global de regeneración en ausencia de un implante o en presencia de un implante que comprende músculo intacto o que comprende músculo descelularizado que carece sustancialmente por completo de miofibras. En determinadas realizaciones, el implante muscular se utiliza para tratar un defecto del músculo esquelético, tal como una hernia abdominal, herida de bala, o trauma ocasionado por fuerza brusca. En algunas realizaciones, el implante muscular se utiliza después de la pérdida de músculo en volumen, por ejemplo, debido a un trastorno de desgaste muscular o debido a la retirada quirúrgica de tejido muscular natural de un paciente (p. ej., a partir de un tratamiento de un sarcoma u osteosarcoma). En determinadas realizaciones, el implante muscular se utiliza para mejorar el aspecto y/o el volumen del tejido muscular en un sitio de implante

60 Descripción de los dibujos

65 La Fig. 1 muestra la tinción con H&E (columna izquierda) y tricromo (columna derecha) de secciones de un defecto de 1 cm² en el músculo glúteo mayor de rata que se había dejado sin tratar. Se obtuvieron secciones 3 semanas (fila superior) y 6 semanas (fila inferior) después de la creación de defectos.

La Fig. 2 muestra la tinción con H&E (columna izquierda) y tricromo (columna derecha) de secciones de un defecto de 1 cm² en el músculo glúteo mayor de rata reparado con Strattice™. Se obtuvieron secciones 3 semanas (fila superior) y 6 semanas (fila inferior) después de la creación de defectos.

5 La Fig. 3 muestra la tinción con H&E (columna izquierda) y tricromo (columna derecha) de secciones de un defecto de 1 cm² en el músculo glúteo mayor de rata reparado con músculo descelularizado preparado según el método Wake Forest. Se obtuvieron secciones 3 semanas (fila superior) y 6 semanas (fila inferior) después de la creación de defectos.

10 La Fig. 4 muestra la tinción con H&E (columna izquierda) y tricromo (columna derecha) de secciones de un defecto de 1 cm² en el músculo glúteo mayor de rata reparado con músculo intacto. Se obtuvieron secciones 3 semanas (fila superior) y 6 semanas (fila inferior) después de la creación de defectos.

15 La Fig. 5 muestra la tinción con H&E (columna izquierda) y tricromo (columna derecha) de secciones de un defecto de 1 cm² en el músculo glúteo mayor de rata reparado con músculo descelularizado que tiene miofibras conservadas. Se obtuvieron secciones 3 semanas (fila superior) y 6 semanas (fila inferior) después de la creación de defectos.

20 La Fig. 6 muestra la tinción con H&E (columna izquierda) y tricromo (columna derecha) de secciones de un defecto de 1 cm² en el músculo glúteo mayor de rata reparado con músculo completamente descelularizado (sin retención de miofibras). Se obtuvieron secciones 3 semanas (fila superior) y 6 semanas (fila inferior) después de la creación de defectos.

25 La Fig. 7 muestra la tinción con H&E de secciones de defectos de 1 cm² en músculo esquelético de rata reparado utilizando músculo descelularizado que tiene una parte de las miofibras conservadas (columna izquierda) y músculo completamente descelularizado (sin retención de miofibras) (columna central), o utilizando una mezcla de ácido hialurónico y polvo de músculo porcino descelularizado que tiene una parte de las miofibras conservadas (“HA-fragmentos de músculo”, arriba a la derecha), o utilizando una mezcla de ácido hialurónico y polvo Strattice™ (“HA-Strattice”, abajo a la derecha). Se obtuvieron secciones después de 3 semanas y 6 semanas en el caso de los defectos reparados con músculo descelularizado que tiene parte de las miofibras conservadas y de los defectos reparados con músculo completamente descelularizado.

30 Se obtuvieron secciones después de 3 semanas para los defectos reparados HA-fragmentos de músculo y HA-Strattice.

35 Descripción de algunas realizaciones ilustrativas

A continuación, se hará referencia con detalle a ciertas realizaciones ilustrativas según la presente descripción, algunos ejemplos de las cuales se ilustran en los dibujos que se acompañan.

40 En la presente descripción se describen implantes musculares que comprenden una o más matrices musculares descelularizadas. En algunas realizaciones, las matrices musculares descelularizadas se preparan seleccionando una muestra adecuada de tejido muscular, lavando la muestra para retirar los glóbulos rojos y otros residuos, exponer la muestra de músculo a tripsina, exponiendo la muestra de músculo a una solución de descelularización, opcionalmente poniendo en contacto la muestra de músculo descelularizada con ADNasa y/o alfa-galactosidasa, lavando la muestra de músculo descelularizada por segunda vez y, opcionalmente, esterilizando la muestra. En determinadas realizaciones, el grado de retirada de miofibras de la muestra de músculo se controla modificando la concentración y/o el período de tiempo en que la muestra de músculo se expone a tripsina y/o a la solución de descelularización. En algunas realizaciones, la matriz muscular descelularizada resultante conserva al menos parte de las miofibras; por ejemplo, aproximadamente 20-80 % de las miofibras presentes en una muestra de músculo antes del procesamiento (descelularización y tratamiento con tripsina).

50 En diversas realizaciones, la retención de al menos parte de las miofibras de la matriz muscular puede traducirse en una mayor velocidad y/o cantidad total de reparación y/o regeneración de músculo natural después de la implantación en un paciente que tiene un defecto muscular que necesita repararse. En algunas realizaciones, la retención de al menos parte de las miofibras de la matriz muscular induce un nivel de inflamación suficiente para reclutar la maquinaria de reparación de músculo natural, mejorando así la cinética y/o el grado de reparación del músculo natural. Por el contrario, un defecto muscular que no recibe un implante o recibe un implante que comprende un tejido descelularizado que carece por completo de miofibras conservadas puede no inducir suficiente inflamación como para reclutar sustancialmente la maquinaria de reparación de músculo natural. Esto puede traducirse en una cinética de regeneración del músculo más lenta y una predominancia de fibroblastos en lugar de la infiltración de mioblastos en el sitio de implante. De la misma manera, un implante que comprende músculo intacto (es decir, músculo que no ha sido descelularizado) puede ocasionar un exceso de inflamación, dando lugar a una mayor formación de tejido cicatrizal y falta de infiltración de mioblastos.

65 En diversas realizaciones, se describe un implante muscular que comprende una matriz muscular descelularizada en forma de partículas. Por ejemplo, las matrices musculares descelularizadas arriba descritas pueden ser cortadas, mezcladas, criofracturadas, u homogeneizadas de cualquier otra manera para formar matrices en forma de partículas que pueden ser liofilizadas y almacenadas en seco, o almacenadas suspendidas en un gel, hidrogel,

u otra solución acuosa. En algunas realizaciones, puede utilizarse una matriz muscular descelularizada en forma de partículas como composición fluida y/o inyectable que puede moldearse fácilmente para rellenar un sitio de implante y utilizarse para reparar un defecto muscular.

5 En la invención, una matriz muscular descelularizada se puede unir a una matriz dérmica descelularizada para formar un implante bicapa. En algunas realizaciones, la matriz dérmica puede proporcionar resistencia estructural inicial y/o capacidad portante de carga, y también puede reforzar la reparación o tratamiento de un defecto muscular permitiendo una regeneración mejorada tanto del músculo como de las capas subyacentes de tejido de fascia. En determinadas realizaciones, la matriz dérmica descelularizada puede mejorar la capacidad del implante bicapa para tolerar las fuerzas de torsión u otras fuerzas experimentadas tras la implantación, estabilizando de este modo el implante durante la migración y proliferación de miocitos hacia la estructura base o andamio proporcionado por la matriz muscular. En algunas realizaciones, la capacidad de soporte de carga de un implante bicapa se transfiere a lo largo del tiempo después de la implantación desde la parte dérmica del implante a la parte de músculo, que es inicialmente más débil, a medida que la regeneración muscular avanza y fortalece el tejido muscular y a medida que el tejido dérmico implantado se degrada. En diversas realizaciones, la matriz muscular y la matriz dérmica se pueden fijar entre sí utilizando pegamentos biocompatibles, suturas y/o cualquier otro medio conocido de fijación de materiales biológicos.

Los implantes musculares de la presente descripción se pueden utilizar para tratar diversos defectos musculares y trastornos relacionados. Por ejemplo, los implantes se pueden utilizar para tratar hernias y otras lesiones musculares de la pared abdominal, donde la práctica estándar actual de cuidados implica, generalmente, el uso de matrices dérmicas totalmente descelularizadas y trasplantes musculares intactos que son más eficaces para favorecer la regeneración de fascia en lugar de la regeneración del músculo suprayacente. En otro ejemplo, los implantes pueden utilizarse para reparar una lesión de pared abdominal debida a trauma, tal como de bala u otra herida debida a fuerza brusca. En otro ejemplo, los implantes pueden utilizarse después de la retirada quirúrgica de tejido en volumen (p. ej., después de la retirada de un sarcoma de tejido blando u osteosarcoma).

Como se usa en la presente descripción, las “miofibras” son las estructuras similares a barras implicadas en la contracción muscular y comprenden proteínas tales como miosina, troponina, tropomiosina y actinina. En y entre las células de músculo alargado (miocitos) hay presentes largas cadenas de miofibras.

Como se usa en la presente descripción, un “defecto muscular” es cualquier anomalía o daño muscular que se puede reparar, mejorar, regenerar y/o tratar mediante una matriz muscular implantada. Un defecto muscular abarca cualquier anomalía o daño debido a enfermedad, trauma, o intervención quirúrgica que produce una alteración en el músculo. Como se usa en la presente descripción, la retirada o pérdida de tejido muscular “de volumen” se refiere a la pérdida de un volumen apreciable y medible de tejido muscular, p. ej., un volumen de al menos aproximadamente 0,5 cm³.

Como se usa en la presente descripción, un “tejido descelularizado” es cualquier tejido del cual se han retirado la mayor parte o la totalidad de las células que normalmente se encuentran en crecimiento en la matriz extracelular del tejido (p. ej., un tejido que carece de aproximadamente 80, 85, 90, 95, 99, 99,5, o 100 % de las células naturales) (o en cualquier porcentaje intermedio).

Los materiales y métodos proporcionados en la presente memoria pueden usarse para fabricar un implante biocompatible. Como se usa en la presente descripción, un implante “biocompatible” es una composición que tiene la capacidad de soportar la migración y proliferación de células naturales del tejido circundante hacia el interior de la composición después del implante y que no provoca una respuesta inmunitaria sustancial que evite dicha actividad celular. Como se usa en la presente descripción, una “respuesta inmunitaria sustancial” es aquella que previene la resorción parcial o completa del material implantado y/o la repoblación parcial o completa del implante con células naturales.

Como se usa en la presente descripción, los términos “células naturales” y “tejido natural” significan las células y el tejido presentes en el tejido/órgano receptor antes de la implantación de un implante muscular, o las células o el tejido producidos por el animal hospedador después del implante.

En esta solicitud, el uso del singular incluye el plural, salvo que se indique lo contrario de forma específica. También en esta solicitud, el uso de “o” significa “y/o” salvo que se indique lo contrario. Además, el uso del término “que incluye”, así como otras formas, tales como “incluye” e “incluido(s) o incluida(s)” no es limitante. Se entenderá que cualquier intervalo descrito aquí incluye los valores extremos y todos los valores entre los valores extremos.

Implantes musculares

60 En la presente descripción se describen implantes musculares. En diversas realizaciones, un implante muscular puede comprender una o más matrices musculares derivadas de tejido humano o animal que se ha descelularizado pero que conserva al menos parte de las miofibras.

Se puede obtener una matriz muscular a partir de cualquier tejido muscular humano o animal que sea adecuado para la descelularización y el posterior implante. En determinadas realizaciones, el músculo es un músculo esquelético. Una matriz muscular puede comprender tejido muscular de uno o más (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5 o más)

músculos diferentes. En determinadas realizaciones, el músculo puede proceder de fuentes humanas o no humanas. Las fuentes no humanas ilustrativas incluyen, aunque no de forma limitativa, cerdos, ovejas, cabras, vacas, conejos, monos y/u otros mamíferos no humanos. Una matriz muscular puede comprender músculo de una o más (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5 o más) fuentes animales diferentes.

En diversas realizaciones, el andamio extracelular dentro de un tejido muscular descelularizado puede consistir en colágeno (especialmente colágeno de tipo I o tipo III), elastina, miofibra, y/u otras fibras, así como proteoglicanos, polisacáridos y/o factores de crecimiento (p. ej., IGF, EGF, Ang 2, HGF, FGF, y/o VEGF). La matriz muscular puede conservar parte de o todos los componentes de la matriz extracelular presentes de forma natural en un músculo antes de la descelularización, o pueden retirarse diversos componentes no deseables por medios químicos, enzimáticos y/o genéticos. Generalmente, la matriz extracelular muscular proporciona un andamio estructural que comprende fibras, proteoglicanos, polisacáridos y factores de crecimiento a los que pueden migrar, y en los que pueden crecer, y proliferar células naturales y vasculatura tras la implantación en un paciente. Los componentes estructurales exactos de la matriz extracelular dependerán del tipo de músculo seleccionado y de los procesos utilizados para preparar el tejido acelular.

En algunas realizaciones, una matriz muscular carece de determinados antígenos no deseables. Por ejemplo, determinados tejidos animales contienen epítomos de alfa-galactosa (α -gal) que son causa conocida de reacciones en los seres humanos. Por lo tanto, las matrices musculares derivadas de estos tejidos animales se pueden producir o procesar de modo que carezcan de determinados antígenos, tales como α -gal. En algunas realizaciones, las matrices musculares carecen de forma sustancialmente completa de α -gal. La retirada de los epítomos de α -gal puede disminuir la respuesta inmunitaria contra la matriz muscular. U. Galili y col., J. Biol. Chem. 263: 17755 (1988). Puesto que los mamíferos no primates (p. ej., los cerdos) producen epítomos de α -gal, el xenotrasplante de músculo descelularizado procedente de estos mamíferos en primates puede producir, en algunos casos, rechazo debido a la unión de anti-gal del primate a los epítomos de α -gal de la matriz muscular. U. Galili y col., Immunology Today 14: 480 (1993); M. Sandrin y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 11391 (1993); H. Good y col., Transplant. Proc. 24: 559 (1992); B. H. Collins y col., J. Immunol. 154: 5500 (1995).

Como se describe en detalle más adelante, en diversas realizaciones, las matrices musculares se pueden procesar para retirar antígenos, tales como α -gal, p. ej., mediante tratamiento químico o enzimático. Alternativamente, en algunas realizaciones, las matrices musculares se pueden producir a partir de animales que han sido modificados genéticamente de modo que carecen de dichos epítomos.

En determinadas realizaciones, un implante muscular puede comprender uno o más agentes adicionales. En algunas realizaciones, el o los agentes adicionales pueden comprender un agente antiinflamatorio, un analgésico o cualquier otro agente terapéutico ventajoso deseado. En ciertas realizaciones, el o los agentes adicionales pueden comprender, p. ej., al menos un factor de crecimiento o señalización añadido (p. ej., un factor de crecimiento celular, un factor angiogénico, un factor de diferenciación, una citocina, una hormona y/o una quimiocina). Estos agentes adicionales pueden favorecer la migración, proliferación y/o vascularización del músculo natural. En algunas realizaciones, el factor de crecimiento o señalización está codificado por una secuencia de ácido nucleico contenida dentro de un vector de expresión. Como se usa en la presente descripción, el término "vector de expresión" se refiere a cualquier constructo de ácidos nucleicos que puede ser adoptado por una célula, que contiene una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína deseada y que contiene las otras secuencias de ácidos nucleicos necesarias (p. ej., promotores, potenciadores, codones de iniciación y terminación, etc.) para garantizar al menos una expresión mínima de la proteína deseada por parte de la célula.

La matriz muscular descelularizada en un implante muscular conserva al menos parte de las miofibras presentes en el tejido muscular antes del procesamiento. En algunas realizaciones, la matriz muscular conserva aproximadamente 20-80 % de las miofibras presentes en el tejido muscular antes del procesamiento (p. ej., aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70, o 80 %) (o en cualquier porcentaje intermedio).

Los implantes musculares descritos en la presente descripción pueden estar o no estar en forma de partículas. Cuando está en forma de partículas, el implante puede tener cualquier forma deseada, p. ej., de hoja, cubo, esfera o cualquier otra forma deseada. En algunas realizaciones, un implante muscular que no es en forma de partículas puede tener un espesor de hasta aproximadamente 20 mm (p. ej., de aproximadamente 5, 10, 15, o 20 mm de espesor, o cualquier espesor intermedio). Los implantes en forma de partículas (p. ej., implantes que han sido cortados, mezclados, criofracturados, u homogeneizados de cualquier otra manera) pueden almacenarse secos (p. ej., liofilizados) o suspendidos en un gel (p. ej., gelatina), hidrogel u otra solución acuosa (p. ej., solución salina tamponada con fosfato o cualquier otra solución salina biocompatible).

En la invención, un implante muscular comprende una matriz muscular descelularizada unida a una matriz dérmica descelularizada para formar un implante bicapa. En algunas realizaciones, la matriz dérmica descelularizada puede comprender ALLODERM® o STRATTICE™ (LIFECCELL Corporation, Branchburg, NJ), que son matrices dérmicas descelularizadas humana y porcina, respectivamente. Alternativamente, se puede utilizar cualquier otra matriz dérmica descelularizada adecuada. En diversas realizaciones, la matriz muscular y la matriz dérmica se pueden fijar entre sí utilizando cualquier medio conocido de fijación de materiales biológicos. Por ejemplo, la matriz muscular y la matriz dérmica se pueden fijar utilizando suturas y/o grapas biocompatibles. En otro ejemplo, se puede utilizar un adhesivo biocompatible (p. ej., adhesivo de fibrina) para fijar las dos capas de matriz. En otro ejemplo, la matriz muscular y la matriz dérmica se pueden unir mecánicamente aplicando presión

a las dos capas y/o exponiendo el implante bicapa a uno o más métodos de reticulación (p. ej., un agente de reticulación química, tratamiento deshidrotérmico, y/o irradiación, incluida irradiación con haz de electrones).

5 En diversas realizaciones, un implante muscular como se describe en la presente descripción puede comprender una o más matrices musculares descelularizadas (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5 o más) y/o una o más matrices dérmicas descelularizadas (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5 o más). Cuando se utiliza más de una matriz muscular y/o matriz dérmica, estas se pueden fijar entre sí utilizando cualquiera de los medios arriba descritos para fijar los implantes bicapa.

10 En diversas realizaciones, un implante muscular puede comprender un tejido descelularizado obtenido de la región de transición entre un músculo y un tendón. Por ejemplo, un implante muscular puede comprender un tejido descelularizado obtenido de la región de transición entre un músculo extensor y un tendón proximal. En algunas realizaciones, la parte de músculo del tejido de la región de transición descelularizado conserva al menos una parte (p. ej., aproximadamente 20-80 %) de las miofibras presentes en el tejido muscular antes del procesamiento. En algunas realizaciones, la parte de tendón del tejido de la región de transición descelularizado conserva parte de o todas las fibrillas de colágeno presentes en el tejido tendonal antes del procesamiento. En diversas realizaciones, la parte de tendón del tejido de la región de transición descelularizado proporciona mayor resistencia a la tracción y/o a la torsión al implante muscular, en comparación con un implante muscular que no comprende tejido tendonal descelularizado.

15 Los implantes musculares, como se ha descrito anteriormente, pueden ser envasados y/o almacenados como productos congelados, liofilizados, hidratados y/o deshidratados. En determinadas realizaciones, los implantes musculares envasados tienen una carga biológica reducida o son estériles. En determinados aspectos de la presente descripción, se proporciona un kit, que comprende uno o más implante(s) muscular(es) envasado(s) e instrucciones para la preparación y/o uso del(de los) implante(s).

25 Métodos para elaboración de implantes musculares

En la presente descripción se describen métodos de elaboración de implantes musculares. En diversas realizaciones, un implante muscular comprende una o más matrices musculares descelularizadas que se preparan seleccionando muestras adecuadas de músculo, lavando las muestras para retirar los glóbulos rojos y otros residuos, exponiendo las muestras de músculo a tripsina, exponiendo las muestras de músculo a una solución de descelularización, opcionalmente poniendo en contacto las muestras de músculo descelularizadas con ADNasa y/o alfa-galactosidasa, lavando las muestras de músculo descelularizadas y, opcionalmente, esterilizando las muestras. En determinadas realizaciones, el grado de retirada de miofibras de la muestra de músculo se controla modificando la concentración y/o el período de tiempo en que la muestra de músculo está expuesta a tripsina y/o a la solución de descelularización. En algunas realizaciones, la matriz muscular resultante conserva al menos una parte de las miofibras.

30 En algunas realizaciones, se puede preparar una matriz muscular a partir de una muestra de cualquier tejido muscular que sea adecuado para la descelularización y el posterior implante. En determinadas realizaciones, la muestra de músculo puede proceder de un tejido muscular de mamífero, tal como de músculo esquelético de un mamífero. En algunas realizaciones, la muestra de músculo utilizada para preparar una matriz muscular puede abarcar la región de transición entre un músculo y un tendón (p. ej., la región de transición entre un músculo extensor y tendón), proporcionando de este modo una muestra de músculo que contiene tanto tejido muscular como de tendón. En determinadas realizaciones, la matriz muscular puede comprender fuentes humanas y/o no humanas. Entre las fuentes de tejido muscular no humanas adecuadas figuran, aunque no de forma limitativa, cerdos, ovejas, cabras, vacas, conejos, monos y/u otros mamíferos no humanos.

40 En algunas realizaciones, se prepara una matriz muscular mediante la descelularización de una muestra de músculo conservándose al mismo tiempo parte de las miofibras. En algunas realizaciones, la matriz muscular descelularizada proporciona una estructura de andamiaje extracelular porosa a la que pueden migrar los miocitos desde el tejido natural circundante y proliferar tras el implante en un sitio hospedador. En determinadas realizaciones, la matriz muscular descelularizada activa los mecanismos inflamatorios y/o de reparación muscular del paciente.

50 En diversas realizaciones, las etapas generales implicadas en la producción de una matriz de músculo descelularizada comprenden proporcionar una muestra de tejido muscular o tejido de región de transición de un donante (p. ej., una fuente de cadáver humano o de tejido animal) y retirar el material celular en condiciones que conservan algunas o todas las funciones biológicas y/o estructurales de la matriz extracelular de la muestra, así como al menos parte de las miofibras.

60 En algunas realizaciones, se puede proporcionar una muestra de tejido muscular y lavarla para retirar todo resto de crioprotectores, glóbulos rojos, y/o cualquier otro contaminante. Las soluciones usadas para el lavado pueden ser cualquier solución fisiológicamente compatible. Los ejemplos de soluciones de lavado adecuadas incluyen agua destilada, solución salina tamponada con fosfato (PBS) o cualquier otra solución salina biocompatible.

65 En determinadas realizaciones, la muestra de tejido muscular puede tratarse químicamente para estabilizar el tejido para evitar la degradación bioquímica y/o estructural antes, durante o después de la retirada de células. En varias realizaciones, la solución estabilizadora detiene e impide la degradación osmótica, hipóxica, autolítica y/o proteolítica; protege frente a la contaminación microbiana; y/o reduce el daño mecánico que puede producirse durante la descelularización. La solución

estabilizadora puede contener un tampón apropiado, uno o más antioxidantes, uno o más agentes oncóticos, uno o más antibióticos, uno o más inhibidores de proteasa y/o uno o más relajantes de músculos lisos.

5 En diversas realizaciones, la muestra de tejido muscular se puede exponer a tripsina para descomponer las agrupaciones de fibra muscular (p. ej., mediante la escisión de moléculas de miosina en la fibra muscular). En algunas realizaciones, la tripsina puede facilitar el proceso de descelularización al incrementar la velocidad y/o el grado de descomposición de miofibras y la retirada de miocitos durante la descelularización posterior. En algunas realizaciones, la muestra de músculo se expone a tripsina a una concentración de aproximadamente 0,02-0,5 % (p. ej., a aproximadamente 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4, 0,45, o 0,5 % (o cualquier porcentaje intermedio). En 10 determinadas realizaciones, la muestra de músculo se expone a tripsina durante al menos aproximadamente 15 minutos y/o hasta un máximo de aproximadamente 120 minutos (p. ej., aproximadamente 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, o 120 minutos) (o cualquier período intermedio). La duración del tiempo de exposición a la tripsina y/o la concentración de tripsina pueden ajustarse para controlar el grado de retirada de miofibra del tejido muscular para retener al menos una parte de las miofibras de la matriz muscular después de la tripsinización y la descelularización. En algunas realizaciones, el 15 tejido tratado con tripsina se neutraliza, por ejemplo, utilizando suero bovino fetal (p. ej., a una concentración de 1-5 %) en solución salina tamponada con fosfato, opcionalmente con la adición de gentamicina (p. ej., a una concentración de 0,1-3 %). En algunas realizaciones, se deja que la reacción de neutralización transcurra durante al menos aproximadamente 1 hora (p. ej., al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, o 5 horas) (o cualquier período intermedio).

20 En diversas realizaciones, la muestra de tejido muscular se puede colocar en una solución de descelularización para retirar las células viables y no viables del tejido muscular sin dañar la integridad biológica y/o estructural de la matriz extracelular. La solución de descelularización puede contener un tampón, una sal, un antibiótico, uno o más detergentes (p. ej., TRITON X-100™, dodecil-sulfato de sodio, desoxicolato de sodio, monolaurato de polioxietileno (20) sorbitán, etc.), uno o 25 más agentes para evitar la reticulación, uno o más inhibidores de proteasa, y/o una o más enzimas adecuadas. En algunas realizaciones, la solución de descelularización comprende 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 1,0 %, 1,5 %, 2,0 %, 2,5 %, 3,0 %, 3,5 %, 4,0 %, 4,5 % o 5,0 % (o cualquier porcentaje intermedio) de TRITON X-100™ y, opcionalmente, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM o 50 mM de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) (o cualquier concentración intermedia). En determinadas realizaciones, la solución de descelularización comprende 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 1,0 %, 1,5 %, 2,0 %, 2,5 %, 3,0 %, 3,5 %, 4,0 %, 4,5 % o 5,0 % (o cualquier porcentaje intermedio) de 30 desoxicolato de sodio y, opcionalmente, 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, 15 mM o 20 mM de tampón HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetasulfónico) conteniendo 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM, o 50 mM de EDTA (o cualquier concentración intermedia). En algunas realizaciones, el tejido muscular se incuba en la solución de descelularización a 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41 o 42 grados centígrados (o cualquier temperatura intermedia) y, 35 opcionalmente, se aplica una agitación suave a 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 o 150 rpm (o cualquier rpm intermedio). La incubación puede tener lugar durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 20, 24, 36, 48 o 96 horas (o cualquier período intermedio). La duración del tiempo de exposición a la solución de descelularización y/o la concentración de detergente y/u otros agentes de descelularización puede ajustarse para controlar el grado de descelularización y retirada de miofibras del tejido muscular. En determinadas realizaciones, pueden usarse detergentes 40 adicionales para retirar células de la muestra de tejido. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se pueden utilizar desoxicolato de sodio y TRITON X-100™ para descelularizar y separar los componentes de tejido no deseables de la matriz de tejido extracelular. La descelularización se puede realizar después de la tripsinización, o viceversa.

45 En diversas realizaciones, la longitud de exposición y/o la concentración de la solución de descelularización y/o la solución de tripsina pueden ajustarse para controlar el grado de retirada de miofibras. En algunas realizaciones, la duración y/o la concentración se seleccionan para retirar aproximadamente 20-80 % de las miofibras presentes normalmente en la muestra de músculo antes de la tripsinización y la descelularización. En determinadas realizaciones, la duración y/o la concentración se seleccionan para retirar aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70 u 80 % o de las miofibras (o cualquier porcentaje intermedio). En algunas realizaciones, se retiran aproximadamente 50 20-80 % de las miofibras exponiendo la muestra de tejido muscular a tripsina a una concentración que varía de aproximadamente 0,01-5 % durante 15-120 minutos y/o exponiendo la muestra de tejido muscular a aproximadamente 0,1-2,0 % de un agente de descelularización (p. ej., TRITON X-100™, dodecilsulfato de sodio, desoxicolato de sodio, polioxietileno (20) monolaurato de sorbitán, etc.) durante 1-72 horas.

55 En diversas realizaciones, se retiran aproximadamente 20-80 % de las miofibras presentes normalmente en una muestra de músculo mediante el control de la relación de tejido a volumen (p. ej., la masa de tejido por volumen de solución que contiene tripsina y/o agentes de descelularización). En algunas realizaciones, una menor relación tejido/volumen aumenta la eficacia del proceso de retirada de miofibras, resultando por lo tanto en una matriz muscular que conserva menos miofibras intactas. En algunas realizaciones, una mayor relación tejido/volumen reduce la eficacia del proceso de retirada 60 de miofibras, resultando por lo tanto en una matriz muscular que conserva más miofibras intactas.

65 En algunas realizaciones, después de la descelularización, el tejido muscular se lava a fondo. Para el lavado puede usarse cualquier solución fisiológicamente compatible. Los ejemplos de soluciones de lavado adecuadas incluyen agua destilada, solución salina tamponada con fosfato (PBS) o cualquier otra solución salina biocompatible. En algunas realizaciones, la solución de lavado puede contener un desinfectante. En ciertas realizaciones, el desinfectante es ácido peracético (PAA), por ejemplo, en una concentración de 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,4 o

0,5 % (o cualquier porcentaje intermedio). En determinadas realizaciones, p. ej., cuando se utiliza material xenogénico o alogénico, el tejido muscular descelularizado se trata (p. ej., durante la noche a temperatura ambiente) con una solución de desoxirribonucleasa (ADNasa). En algunas realizaciones, la muestra de tejido se trata con una solución de ADNasa preparada en un tampón de ADNasa (p. ej., 20 mM de tampón HEPES (ácido 4-(2-hidroxi)etil)-1-piperazinetanosulfónico), 20 mM de CaCl_2 y 20 mM de MgCl_2). Opcionalmente puede añadirse una solución de antibiótico (p. ej., gentamicina) a la solución de DNasa. Puede utilizarse cualquier antibiótico y/o tampón de ADNasa adecuado siempre y cuando el tampón y/o el antibiótico proporcione(n) actividad de ADNasa adecuada.

Aunque el tejido muscular descelularizado en un implante muscular puede derivarse de uno o más animales donantes de la misma especie que el animal receptor previsto, no tiene por qué ser así. Por lo tanto, por ejemplo, el tejido muscular descelularizado se puede preparar a partir de tejido porcino e implantar en un paciente humano. Las especies que pueden servir como donantes y/o receptores de tejido muscular descelularizado incluyen, aunque no de forma limitativa, mamíferos, tales como humanos, primates no humanos (p. ej., monos, babuinos o chimpancés), cerdos, vacas, caballos, cabras, ovejas, perros, gatos, conejos, cobayas, jerbos, hámsters, ratas, o ratones. En algunas realizaciones, puede usarse tejido muscular de más de un animal donante.

En determinadas realizaciones, el tejido muscular utilizado para preparar una matriz muscular se puede tratar con una o más enzimas para retirar antígenos no deseables, p. ej., un antígeno no expresado normalmente por el animal receptor y que posiblemente dé lugar por lo tanto a una respuesta inmunitaria y/o rechazo de un implante muscular que comprende la matriz muscular. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el tejido muscular se puede tratar con alfa-galactosidasa para retirar restos alfa-galactosa (α -gal). En algunas realizaciones, para retirar enzimáticamente epítomos de α -gal, después de lavar el tejido muscular a fondo con solución salina, el tejido puede someterse a uno o más tratamientos enzimáticos para retirar los antígenos de α -gal, si están presentes en la muestra. En determinadas realizaciones, el tejido muscular puede tratarse con una enzima α -galactosidasa para eliminar sustancialmente los epítomos de α -gal. En una realización, el tejido se trata con α -galactosidasa a una concentración de aproximadamente 0,2 U/ml preparada en 100 mM de una solución salina tamponada con fosfato con un pH 6,0. En otras realizaciones, la concentración de α -galactosidasa se reduce a aproximadamente 0,1 U/ml o se aumenta a aproximadamente 0,3, 0,4 o 0,5 U/ml (o cualquier valor intermedio). En otras realizaciones, puede usarse cualquier concentración de enzima y tampón adecuados, siempre que se consiga una eliminación suficiente de antígeno. Además, en Xu y col., *Tissue Engineering*, Vol. 15, 1-13 (2009) se describen algunos métodos ilustrativos de procesamiento de tejidos para reducir o eliminar restos de alfa-1,3-galactosa.

En determinadas realizaciones, pueden seleccionarse animales que se hayan modificado genéticamente de modo que carezcan de uno o más epítomos antigénicos como fuente de tejido para una matriz muscular. Por ejemplo, pueden seleccionarse animales (p. ej., cerdos) que se hayan modificado genéticamente para que carezcan de la expresión del resto terminal α -galactosa como fuente de tejido. Véanse las descripciones de animales y métodos apropiados para producir animales transgénicos para xenotransplante en la solicitud de patente US-10/896.594 y la patente US-6.166.288.

En algunas realizaciones, puede tratarse un implante muscular para reducir la carga biológica (es decir, para reducir el número de microorganismos que crecen en el implante). En algunas realizaciones, el implante tratado carece sustancialmente por completo de carga biológica (es decir, el implante es aséptico o estéril). El experto en la técnica conoce métodos adecuados de reducción de carga biológica, que pueden incluir exponer el implante muscular a un compuesto tal como ácido peracético (PAA) o a radiación. La irradiación puede reducir o eliminar sustancialmente la carga microbiana. En algunas realizaciones, se libera una dosis absorbida de aproximadamente 14-18 KGy de radiación de haz de electrones para reducir o eliminar sustancialmente la carga microbiana. En diversas realizaciones, se expone un implante muscular a un nivel de entre aproximadamente 5 Gy y 50 KGy de radiación (p. ej., aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 KGy, o cualquier valor intermedio). Las formas adecuadas de radiación pueden incluir radiación gamma, radiación de haz de electrones y radiación de rayos X. Otros métodos de irradiación se describen en la solicitud de patente US-2010/0272782.

En determinadas realizaciones, pueden añadirse uno o más agentes adicionales a un implante muscular. En algunas realizaciones, el agente adicional puede comprender un agente antiinflamatorio, un analgésico, o cualquier otro agente terapéutico o ventajoso deseado. En ciertas realizaciones, el agente adicional puede comprender, al menos, un factor de crecimiento o señalización añadido (p. ej., un factor de crecimiento celular, un factor angiogénico, un factor de diferenciación, una citoquina, una hormona y/o una quimiocina). En algunas realizaciones, estos agentes adicionales pueden favorecer la migración, proliferación y/o vascularización de miocitos naturales en la matriz extracelular de un implante muscular. En algunas realizaciones, el factor de crecimiento o señalización está codificado por una secuencia de ácido nucleico contenida dentro de un vector de expresión. Como se usa en la presente descripción, el término "vector de expresión" se refiere a cualquier constructo de ácidos nucleicos que es capaz de ser adoptado por una célula, que contiene una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína deseada y que contiene las otras secuencias de ácidos nucleicos necesarias (p. ej., promotores, potenciadores, codón de terminación, etc.) para garantizar al menos una expresión mínima de la proteína deseada por la célula.

En diversas realizaciones, se prepara un implante muscular uniendo una matriz muscular descelularizada a una matriz dérmica descelularizada para formar un implante bicapa. En algunas realizaciones, la matriz dérmica descelularizada se prepara descelularizando una muestra de tejido dérmico conservando al mismo tiempo al menos una parte de los componentes extracelulares (p. ej., el andamio de colágeno) en el tejido dérmico. En la patente US-6.933.326 y la

solicitud de patente de EE. UU. n.º 2010/0272782 se describen métodos ilustrativos para la descelularización de tejido dérmico y preparación de matrices de tejido dérmico descelularizadas. En determinadas realizaciones ilustrativas, una matriz dérmica descelularizada comprende ALLODERM® o STRATTICE™ (LifeCell Corporation, Branchburg, NJ), que son productos dérmicos humanos y productos dérmicos porcinos descelularizados, respectivamente. Alternativamente, se puede utilizar cualquier otra matriz dérmica descelularizada adecuada.

En diversas realizaciones, el músculo descelularizado y las matrices dérmicas de un implante bicapa se fijan entre sí utilizando cualquier medio conocido de fijación de materiales biológicos. Por ejemplo, la matriz muscular y la matriz dérmica se pueden fijar utilizando suturas y/o grapas biocompatibles. En otro ejemplo, se pueden utilizar adhesivos biocompatibles (p. ej., adhesivo de fibrina) para fijar las dos capas de matriz. En otro ejemplo, la matriz muscular y la matriz dérmica se pueden unir mecánicamente aplicando presión a las dos capas y/o exponiendo el implante bicapa a uno o más métodos de reticulación (p. ej., un agente de reticulación química, tratamiento deshidrotérmico, y/o irradiación, incluida irradiación con haz de electrones).

En diversas realizaciones, se prepara un implante muscular que comprende una o más matrices musculares descelularizadas (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5 o más) y/o una o más matrices dérmicas descelularizadas (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5 o más). Cuando se utiliza más de una matriz muscular y/o matriz dérmica, estas se pueden fijar entre sí utilizando cualquiera de los medios arriba descritos para fijar implantes bicapa.

En diversas realizaciones, se puede proporcionar un implante muscular en forma de partículas. Por ejemplo, un implante muscular que comprende una o más matrices musculares descelularizadas y/o una o más matrices dérmicas descelularizadas se puede cortar, mezclar, homogeneizar, liofilizar y/o criofracturar. El implante muscular en forma de partículas se puede almacenar seco (p. ej., liofilizar) o en una solución acuosa. En algunas realizaciones, se proporciona un implante muscular en forma de partículas previamente cargado en una jeringa para facilitar su suministro quirúrgico a un sitio de implante.

Métodos de uso

En diversas realizaciones, un implante muscular que comprende una matriz muscular descelularizada que conserva al menos parte de las miofibras se puede implantar en un paciente (p. ej., para rellenar una región de pérdida de volumen muscular o para mejorar cosméticamente un tejido muscular). En algunas realizaciones, las miofibras que permanecen en la matriz muscular pueden inducir una respuesta inflamatoria en el sitio de implante. En algunas realizaciones, la respuesta inflamatoria es suficiente para iniciar y/o reforzar la maquinaria de reparación muscular del paciente sin causar una inflamación excesiva que podría dar lugar a una mayor formación de tejido cicatrizal y/o rechazo de implante. En algunas realizaciones, la inducción de una respuesta inflamatoria inicia y/o refuerza la reparación muscular en el paciente, p. ej., mediante el reclutamiento de macrófagos y mioblastos que infiltran la matriz muscular, y activación de las células satélite que se diferencian en músculo dentro del andamio proporcionado por la matriz muscular, remodelando por lo tanto el implante en tejido muscular. En diversas realizaciones, la activación de la maquinaria de reparación muscular innata aumenta el grado y/o la cinética de reparación/regeneración muscular en la zona del implante. En cambio, la reparación muscular en ausencia de un implante, o cuando se utiliza un implante que comprende músculo intacto o tejido descelularizado que carece totalmente de miofibras, da lugar a una velocidad más lenta de reparación muscular y un nivel inferior de formación de tejido muscular (y un aumento paralelo de la formación de tejido conjuntivo y/o cicatrizal).

En diversas realizaciones, se utiliza un implante muscular que comprende una o más matrices musculares descelularizadas y una o más matrices dérmicas descelularizadas. La matriz dérmica de forma típica proporciona un material más fuerte inicialmente, uno que puede resistir mejor las fuerzas de tracción, torsión, y otras fuerzas experimentadas por el implante, protegiendo de este modo la matriz muscular subyacente de daño o deformación durante el proceso de reparación/regeneración. En algunas realizaciones, la matriz dérmica también puede proporcionar un andamio en el cual las células naturales (p. ej., fibroblastos, etc.) pueden migrar, permitiendo la remodelación de la fascia y/o la dermis junto con el músculo remodelado inducido por la matriz muscular.

En diversas realizaciones, se utiliza un implante muscular que comprende tejido descelularizado obtenido de la región de transición entre un músculo y un tendón. En diversas realizaciones, la parte de tendón del tejido de la región de transición descelularizado proporciona mayor resistencia a la tracción y/o a la torsión al implante muscular, en comparación con un implante muscular que no comprende tejido tendonal descelularizado. En algunas realizaciones, la resistencia aumentada permite que el implante resista mejor las fuerzas de tracción, torsión y otras fuerzas que experimenta el implante durante el proceso de regeneración. En algunas realizaciones, la parte de tendón descelularizado del implante proporciona un andamio de colágeno hacia el cual pueden migrar las células naturales (p. ej., fibroblastos, etc.) permitiendo la remodelación de la fascia junto con el músculo remodelado inducido por la parte de músculo descelularizado del implante.

En algunas realizaciones, se puede utilizar un implante muscular en forma de partículas para rellenar un espacio vacío en un tejido muscular. Por ejemplo, se puede hacer fluir un implante muscular en forma de partículas en solución acuosa hacia un sitio de implante, rellenando un espacio deseado y/o aumentando el volumen de un tejido muscular. En algunas realizaciones, se puede utilizar un implante muscular en forma de partículas para empaquetar el espacio alrededor de un implante muscular que no es en forma de partículas para rellenar más totalmente el sitio de implante.

Un implante muscular, según se describe en la presente descripción, puede utilizarse en cualquier procedimiento quirúrgico donde se desee reparación, modificación, regeneración, y/o mejora del tejido muscular. Por ejemplo, se puede utilizar un implante muscular en la reparación de defectos de la pared abdominal (p. ej., reparación de hernia, herida de bala, u otro tipo de trauma abdominal). Cuando se utiliza un implante que comprende una o más matrices musculares descelularizadas y una o más matrices dérmicas descelularizadas, la matriz muscular en el implante puede favorecer la regeneración muscular mientras que la matriz dérmica del implante favorece la reparación de la fascia subyacente. En cambio, los procedimientos quirúrgicos actuales (p. ej., el uso de suturas y/o matrices dérmicas descelularizadas implantadas que carecen de miofibras) producen una reparación sustancial de la fascia pero una mínima reparación o regeneración de músculo subyacente. La falta de regeneración del músculo subyacente con los procedimientos quirúrgicos actuales puede traducirse en un mayor grado de hinchazón, formación de cicatrices y otras complicaciones.

En algunas realizaciones, también se puede utilizar un implante muscular después de la extracción quirúrgica de tejido muscular en volumen (p. ej., después de la intervención quirúrgica para retirar un sarcoma o un osteosarcoma). En estas realizaciones, el implante muscular puede iniciar y/o mejorar la velocidad y el volumen global de reparación muscular mediante la inducción de un nivel suficiente (pero no excesivo) de inflamación que sirve para reclutar las rutas de reparación del músculo del paciente (p. ej., reclutamiento de macrófagos/mioblastos y activación de las células satélite). En cambio, la velocidad y el volumen global de reparación muscular se reduce en pacientes que no reciben un implante muscular y en pacientes que reciben un implante que comprende tejido muscular intacto o descelularizado que carece por completo de miofibras. Similarmente, en los procedimientos quirúrgicos donde se cosecha el tejido muscular de un músculo para el trasplante en otra ubicación del paciente, se puede colocar un implante muscular como se ha descrito anteriormente en el sitio de recolección como ayuda para estimular la velocidad y el grado global de reparación muscular en el sitio de recolección después del procedimiento de trasplante.

En algunas realizaciones, se puede utilizar un implante muscular para mejorar el volumen de músculo natural. Por ejemplo, se puede utilizar un implante muscular como parte de un tratamiento para una enfermedad de desgaste muscular, mejorando de este modo la velocidad de reparación y de regeneración, y/o aumentando el volumen global de músculo en el sitio de implante. En otro ejemplo, el implante se puede utilizar para mejorar cosméticamente el aspecto de tejido muscular favoreciendo el crecimiento de volumen muscular adicional en el sitio de implante.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar y no para limitar en modo alguno la presente descripción.

Ejemplo 1: Preparación de implante muscular

Se diseccionó músculo esquelético porcino y se lavó durante tres días para eliminar glóbulos rojos. Se trataron muestras de músculo con tripsina al 0,25 % durante 1 hora antes de neutralizar durante 2 horas utilizando suero bovino fetal a 5 % diluido en PBS y gentamicina a 1 %. Las muestras se colocaron a continuación en una solución de descelularización que contenía desoxicolato sódico más Triton X-100 0,2 % durante la noche, antes de lavarla con solución de HEPES durante una hora. Las muestras se trataron con ADNasa durante la noche para eliminar el ADN restante en el tejido y, a continuación, se trataron durante la noche con alfa-galactosidasa para retirar los epítopos de alfa-gal del tejido. Las muestras se expusieron a PAA durante 2 horas, se lavaron, y se expusieron a radiación de haz de electrones.

El grado de retirada de miofibras se ajustó mediante el control de la exposición a tripsina y a la solución de descelularización.

El análisis del músculo descelularizado indicó niveles no significativos de IGF, EGF, Ang 2 y HGF, con detección de cantidades traza de VEGF. Al reducir el tiempo de procesamiento, las matrices musculares descelularizadas conservaron cantidades significativas de FGF. Un análisis de colágeno en las matrices intactas y descelularizadas mostró la presencia de colágeno I y colágeno III, con un predominio de colágeno I.

Ejemplo 2: Reparación de defectos de tamaño crítico en el músculo

Se realizó un defecto de tamaño crítico de 1 cm² en músculo glúteo mayor de ratas y se evaluó en dos momentos: a las 3 y las 6 semanas después de la operación. El defecto de 1 cm² representa un tamaño estándar utilizado en el estudio de la pérdida volumétrica de músculo. Cuando se dejaron sin tratar, se produjo muy poca reparación en el defecto a las 3 semanas y 6 semanas, pero se observó cierta actividad de miogénesis en los extremos del músculo dañado. Fig. 1.

Para evaluar la eficacia de diferentes implantes, se utilizaron 5 grupos de reparación: defectos reparados con Strattice™, defectos reparados utilizando músculo porcino descelularizado preparado según el método Wake Forest, defectos reparados con músculo porcino intacto, defectos reparados con músculo porcino descelularizado que conservaba una parte de las miofibras (como se describe en el ejemplo 1) y defectos reparados con músculo porcino completamente descelularizado que carecían por completo de miofibras conservadas. El método Wake Forest para preparar una matriz de tejido implica una etapa de tripsinización, seguida de neutralización de tripsina y 5 días de descelularización en una solución a 1 % de Triton X-100 (sin tratamiento de ADNasa o alfa-gal).

Como se muestra en la Fig. 2, los defectos reparados utilizando Strattice™ no mostraron señales de integración en el músculo esquelético al cabo de 3 o 6 semanas. Los implantes tenían cierto grado de infiltración celular, pero no mostraban señales de miogénesis al cabo de 3 o 6 semanas.

Como se muestra en la Fig. 3, el defecto reparado utilizando músculo descelularizado preparado según el método Wake Forest indujo inflamación de gran escala en todo el implante después de 3 semanas. No había borde de cápsula fibrosa detectable después de 3 semanas, y el implante no era detectable después de 6 semanas. El defecto parecía casi totalmente reparado al cabo de 6 semanas.

Como se muestra en la Fig. 4, cuando el defecto se reparó utilizando músculo intacto, el implante todavía era detectable al cabo de 3 semanas y 6 semanas, con una inflamación significativa alrededor del borde del implante. Al menos parte del implante permanecía intacto al cabo de 6 semanas, con una cantidad significativa de miogénesis alrededor del borde del implante.

Como se muestra en la Fig. 5, cuando el defecto se reparó utilizando músculo descelularizado que mantenía una parte de las miofibras, el implante todavía era perceptible al cabo de 3 semanas pero no detectable al cabo de 6 semanas. La inflamación observada al cabo de 3 semanas era de un nivel inferior a la observada para el método Wake Forest. Al cabo de 6 semanas se observó una curación del defecto casi perfecta.

Como se muestra en la Fig. 6, cuando el defecto se reparó utilizando músculo porcino completamente descelularizado que carecía por completo de miofibras conservadas, el implante era detectable tanto al cabo de 3 semanas como de 6 semanas después de la implantación. Al cabo de 3 semanas se observó algo de inflamación, que se redujo al cabo de 6 semanas. La cinética de la regeneración muscular era muy lenta y comparable a la cinética observada cuando se utilizó Strattice™.

Para evaluar de forma adicional la capacidad de los diferentes implantes para inducir regeneración muscular, se tiñeron muestras de tejido para MYH3, un marcador muscular embrionario que está aumentado transitoriamente durante las etapas iniciales de la miogénesis. No se observó expresión de MYH3 en implantes de Strattice™, se observó cierto grado de expresión en implantes intactos y completamente descelularizados de Wake Forest, y se observaron niveles de expresión elevados en el caso de los implantes descelularizados que mantenían una cierta cantidad de miofibras.

Ejemplo 3: Suministro inyectable de músculo descelularizado

Se utilizó un modelo de herida de escisión (defecto de músculo esquelético de 1 cm x 1 cm x 0,5 cm) para evaluar el potencial de regeneración muscular del músculo esquelético descelularizado de ratas Sprague Dawley. En este estudio se utilizaron 30 ratas divididas en 4 grupos de 6 animales cada uno. En los grupos 1 y 2, el tejido escindido se reparó rellenando el defecto con músculo esquelético porcino descelularizado que conservaba en parte o no conservaba miofibras, respectivamente. En el grupo 3, el defecto muscular se rellenó con una mezcla similar a una pasta de solución de ácido hialurónico (HA, 5 % en peso) y un polvo de músculo porcino descelularizado que conservaba una parte de las miofibras (200 mg/ml). En el grupo 4, el defecto muscular se rellenó con una mezcla similar a pasta de polvo de Strattice™ mezclado con solución de HA. Los grupos 3 y 4 se utilizaron para evaluar un enfoque inyectable para suministrar implantes musculares descelularizados.

Después de la implantación, los animales se observaron diariamente para identificar señales clínicas anormales, con especial atención a los cambios potenciales en los patrones correspondientes al modo de caminar de las ratas. Se sacrificaron tres animales de cada grupo al cabo de 3 semanas y los otros tres animales se sacrificaron 6 semanas después del implante. La tabla 1 resume los grupos de tratamiento y los puntos finales experimentales.

Tabla 1

Grupo	Material de ensayo	Tratamientos	Número de animales	Momento (semanas)
1	músculo descelularizado con miofibras conservadas	Implantado el día de creación de defecto	6	3, 6
2	Músculo completamente descelularizado - sin conservación de miofibras	Implantado el día de creación de defecto	6	3, 6
3	Solución de HA + fragmentos de músculo descelularizado	Implantado el día de creación de defecto	3	3

(continuación)

Grupo	Material de ensayo	Tratamientos	Número de animales	Momento (semanas)
4	Solución de HA + fragmentos de Strattice™	Implantado el día de creación de defecto	3	3

5 La influencia del tratamiento en la regeneración muscular se estudió evaluando el grado de reparación muscular a partir de métodos de histopatología e inmunotinción. El implante del grupo 1 era visible durante la observación superficial al cabo de 3 semanas pero ya no era distinguible de la mayor parte del tejido hospedador al cabo de 6 semanas. El tamaño del injerto muscular también era perceptiblemente más pequeño que el tamaño del injerto inicial. La disección histológica del implante del grupo 1 al cabo de 3 semanas mostró la respuesta inflamatoria prevista alrededor del borde del tejido que es típica de la reparación muscular. No se observó ninguna cápsula fibrosa en ningún momento del estudio. La sección histológica al cabo de 6 semanas mostró una excelente reparación muscular, en la que el defecto muscular estaba casi completamente curado con tejido muscular del hospedador. En comparación, el implante del grupo 2 era visible tanto al cabo de 3 como de 6 semanas. La sección histológica para el implante del grupo 2 mostraba una cantidad significativa de infiltración celular e inflamación al cabo de 3 semanas después de la implantación. La respuesta inflamatoria disminuyó al cabo de 6 semanas y la región del tejido implantado se transformó en tejido de tipo fascia al cabo de 6 semanas.

15 Los defectos reparados con HA-fragmentos musculares y HA-Strattice™ (grupos 3 y 4) se evaluaron únicamente en el momento correspondiente a las 3 semanas, cuando se decidió que no eran necesarios grupos adicionales de animales. Con el tratamiento de HA-fragmento muscular, hubo 2 casos de infección en el tejido implantado. El resto de ratas tratadas con HA-fragmentos de músculo experimentó una inflamación significativa al cabo de 3 semanas, mientras que la sección histológica reveló un agujero grande sin rellenar correspondiente al defecto muscular. La observación superficial del tejido mostraba un tejido considerablemente más delgado donde se había creado el defecto muscular. Las ratas que recibieron la solución de HA-fragmento de Strattice™ no parecieron retener el implante en el sitio de defecto del músculo. No había una infiltración celular significativa alrededor de la solución inyectada, sino solo una cantidad limitada de penetración celular en el núcleo de la matriz de solución de HA-Strattice™. La Fig. 7 muestra la tinción con H&E para los diferentes grupos de tratamiento a las 3 semanas y 6 semanas después de la implantación.

20 Por lo tanto, de los diferentes tipos de constructos derivados de músculo/dérmicos evaluados en este estudio, un injerto de músculo descelularizado que conserva algunas miofibras parece haber superado las otras ramificaciones de ensayo. Sin pretender imponer ninguna teoría, el estudio ayuda a confirmar la hipótesis de que la retención de miofibras produce niveles adecuados de inflamación en la etapa inicial de la regeneración suficiente para inducir la curación completa del músculo en 6 semanas. En cambio, la matriz muscular completamente descelularizada (sin conservación de miofibras) no pudo inducir un nivel similar de regeneración y permaneció en forma similar a fascia a las 6 semanas después de la implantación. Los intentos de usar un método inyectable no produjeron resultados deseables en este informe, ya que hubo casos de infección y/o retención deficiente en el sitio correspondiente al defecto. Un método alternativo con una solución más semejante a un gel (p. ej., hidrogel) en lugar de una solución similar a un fluido puede proporcionar una mayor posibilidad de retención.

Ejemplo 4: Implante bicapa

40 Se creó un implante bicapa que comprendía músculo descelularizado y Strattice™ utilizando adhesivo de fibrina para unir entre sí las capas. El implante bicapa tenía una resistencia de unión de aproximadamente 1 N y un módulo de unión de 31 kPa + / - 20,1. Utilizando el mismo método de adhesivo de fibrina, sería posible apilar múltiples capas de músculo descelularizado y/o Strattice™ para formar un implante multicapa. Además, se prepararon bicapas mediante sutura respectiva de capas de Strattice™ y músculo descelularizado.

45 Los implantes bicapa y multicapa pueden implantarse durante la reparación de la hernia abdominal. Después de la implantación, se mide el grado de miogénesis e infiltración de fibroblastos y se compara con la infiltración de miogénesis y fibroblastos en ausencia de un implante o en presencia de un implante que comprende músculo intacto o tejido totalmente descelularizado (p. ej., tejido descelularizado que carece de miofibras).

50 Una ventaja de utilizar implantes bicapa en defectos de la pared abdominal y defectos similares es que el tejido dérmico del implante puede proporcionar capacidad portante inicial, aunque con el tiempo la capacidad portante se transfiere a la parte de músculo correspondiente al implante (que inicialmente es más débil) a medida que avanza la regeneración muscular y el tejido dérmico se degrada. Por ejemplo, se evaluó un defecto de pared abdominal parcial en ratas utilizando implantes bicapa. Se resectaron secciones de músculo recto (1,0x0,5 cm) y se rellenaron con un implante que contenía matriz dérmica acelular porcina (PADM, Strattice™) o PADM suturada sobre una de las dos matrices de músculo de las cuales se habían retirado parcialmente las miofibras (contenido residual de miofibras de aproximadamente 70 % o contenido residual de miofibras de aproximadamente 20 %). Los implantes se evaluaron después de 3 y 6 semanas.

60 La tinción histológica con tricromo de los implantes al cabo de tres semanas demostró una regeneración muscular mejorada en los implantes bicapa, en comparación con el implante de PADM solo. Después de 6 semanas, se

observó una regeneración muscular sustancial para ambos implantes bicapa, observándose solo una regeneración muscular mínima en el implante de PADM. Se observó un músculo esencialmente normal en el implante bicapa que contenía 70 % de miofibra residual al cabo de seis semanas, mientras que el implante que contenía 20 % de miofibra residual mostró una regeneración ligeramente menos completa.

5 Los datos del implante bicapa confirman que estos implantes pueden inducir la reparación del músculo esquelético en un modelo de defectos parciales de la pared abdominal, observándose una regeneración aproximadamente completa al cabo de seis semanas. Los implantes bicapa reflejan también la especificidad del tejido del proceso de regeneración muscular - se observó una regeneración muscular mínima en el modelo de PADM solo, mientras que se observó una regeneración muscular más sustancial en los implantes bicapa. Los datos también demuestran que la cinética de la regeneración muscular está relacionada con el contenido de miofibra de la bicapa implantada. Los implantes bicapa que contenían tejido muscular procesado con aproximadamente 70 % de contenido de miofibra pudieron inducir una regeneración muscular más rápida que las bicapas que contenían tejido muscular procesado con aproximadamente 20 % de contenido residual de miofibra.

10
15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un implante muscular que comprende al menos una capa de la matriz muscular descelularizada que contiene al menos parte de las miofibras presentes normalmente en una muestra de músculo no procesada en donde al menos una capa de la matriz muscular descelularizada se une al menos a una capa de la matriz de tejido dérmico descelularizado.
- 10 2. El implante muscular de la reivindicación 1, en donde la matriz muscular descelularizada carece sustancialmente de todas las fracciones de alfa-galactosa.
- 15 3. El implante muscular de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde el implante comprende más de una capa de la matriz muscular descelularizada.
- 20 4. El implante muscular de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el implante comprende más de una capa de matriz dérmica descelularizada.
- 25 5. El implante muscular de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde al menos una matriz muscular descelularizada y al menos una matriz dérmica descelularizada se unen con adhesivo de fibrina o con suturas.
- 30 6. El implante muscular de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el implante muscular carece sustancialmente de carga biológica.
- 35 7. El implante muscular de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde al menos una capa de la matriz muscular descelularizada se une al menos a una capa de la matriz de tejido dérmico descelularizado por reticulación.
- 40 8. Un método de preparación de un implante muscular según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende
 30 proporcionar al menos una muestra de músculo;
 poner en contacto al menos una muestra de músculo con una solución que contiene tripsina;
 descelularizar al menos una muestra de músculo para producir al menos una matriz muscular descelularizada; y
 35 controlar la duración de la exposición y la concentración de la solución de tripsina para conservar al menos parte de las miofibras presentes normalmente en la muestra de músculo antes del procesamiento, y unir al menos una matriz muscular descelularizada al menos una matriz dérmica descelularizada para formar una material estratificado.
- 45 9. El método de la reivindicación 8, en donde la solución de tripsina contiene de un 0,02 % a un 0,5 % de tripsina.
- 50 10. El método de la reivindicación 8 o 9, en donde al menos una muestra de músculo se descelulariza poniendo en contacto la muestra con una solución de descelularización que comprende al menos uno de TRITON X-100™, dodecilsulfato de sodio, desoxicolato de sodio, y monolaurato de polioxietileno (20) sorbitán.
- 55 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 8-10, que comprende, además, poner en contacto al menos una muestra de músculo con ADNasa, y/o
 50 que comprende, además, poner en contacto al menos una muestra de músculo con alfa-galactosidasa, o en donde al menos una muestra de músculo es de un animal que carece sustancialmente por completo de restos alfa-galactosa.
- 60 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 8-11, que comprende, además, unir al menos una matriz muscular descelularizada a más de una matriz dérmica descelularizada, y/o al menos una matriz muscular descelularizada es más de una matriz muscular descelularizada, y/o en donde al menos una matriz muscular descelularizada y al menos una matriz dérmica descelularizada se unen usando adhesivo de fibrina o suturas.
- 65 13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 8-12, que comprende además tratar el implante muscular para reducir la carga biológica, especialmente en donde el implante muscular se expone a radiación de haz de electrones.
14. Un implante muscular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7 preparado según el método de una cualquiera de las reivindicaciones 8-13.
15. Un implante muscular según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para usar en un método de tratamiento para mejorar el aspecto y/o el volumen de tejido muscular en un sitio de implante, que comprende implantar dicho implante en un paciente, especialmente en donde el implante muscular se

- 5 utiliza para tratar un defecto del músculo esquelético, especialmente en donde el defecto del músculo esquelético es una hernia abdominal, o una herida de bala o un trauma ocasionado por fuerza brusca, o en donde el implante muscular se utiliza después de la pérdida o retirada de tejido muscular en volumen, especialmente donde la pérdida de tejido muscular en volumen se debe a un trastorno de desgaste muscular, o se debe a la retirada quirúrgica de tejido muscular natural de un paciente, especialmente en donde el tejido muscular natural se retira como parte de un tratamiento de un sarcoma u osteosarcoma.

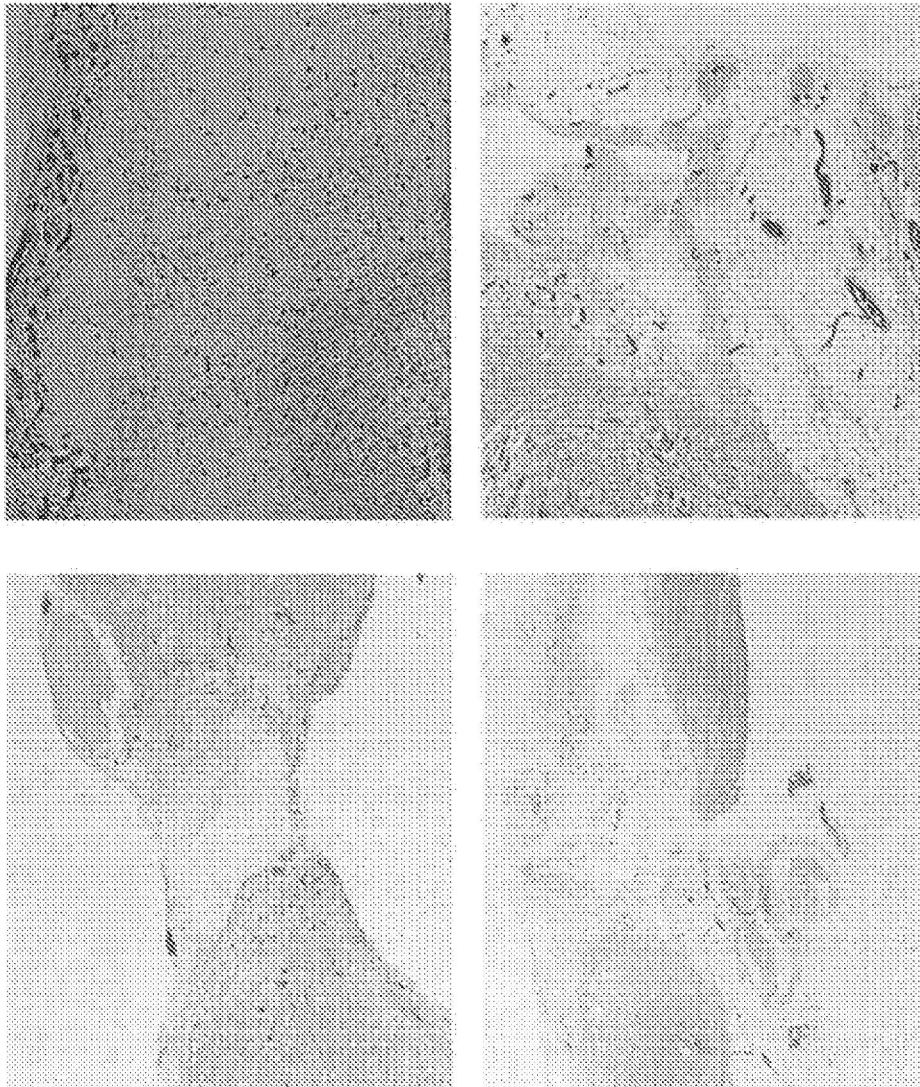


FIG. 1

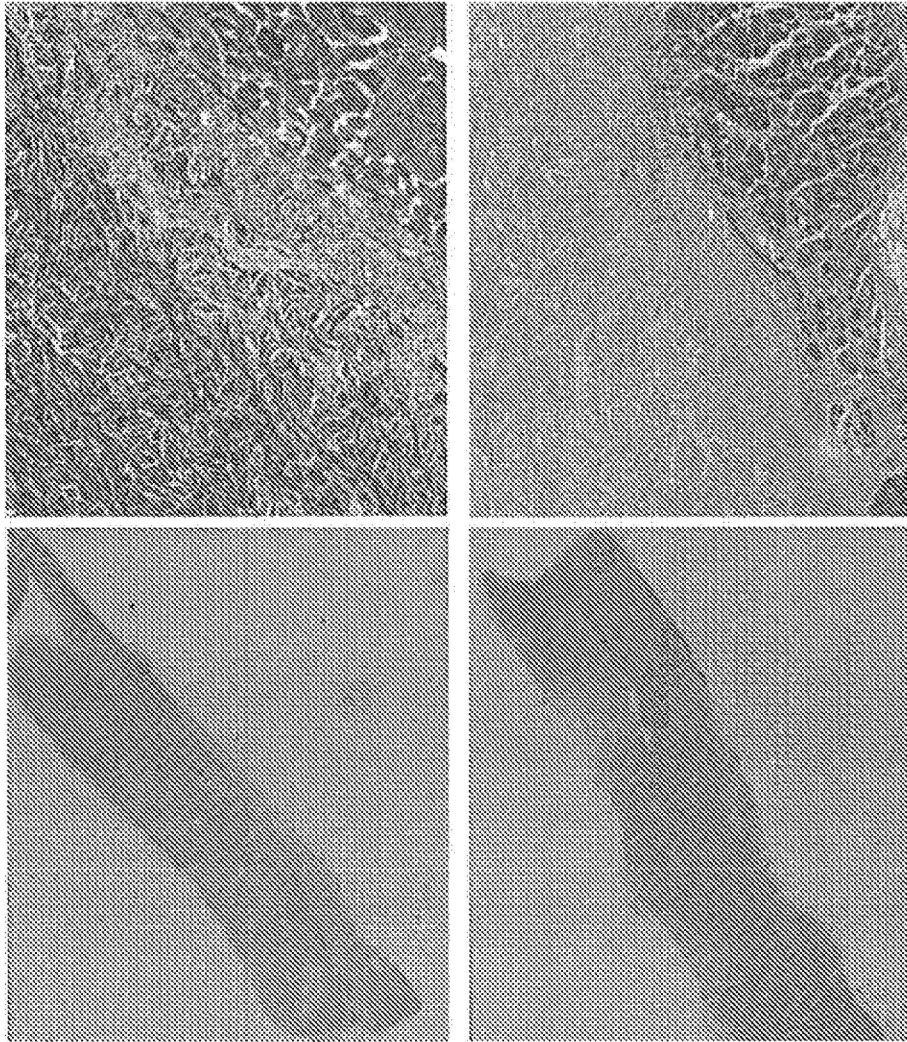


FIG. 2

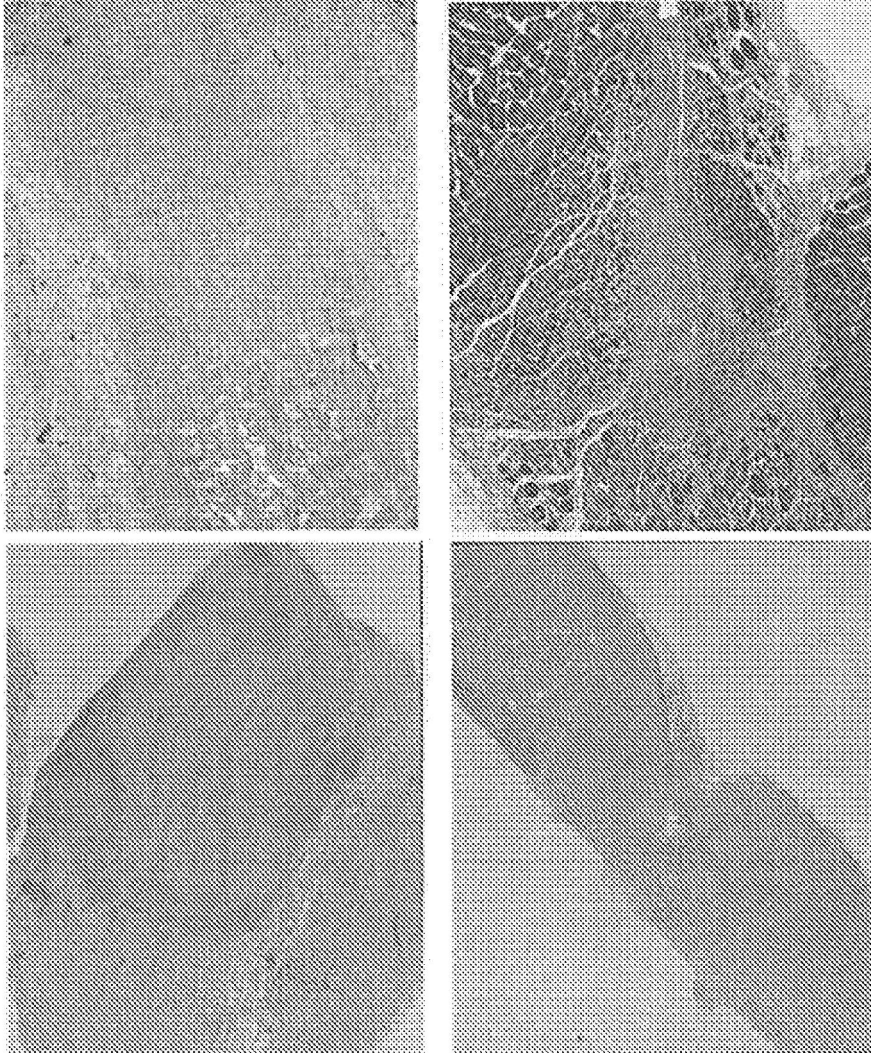


FIG. 3

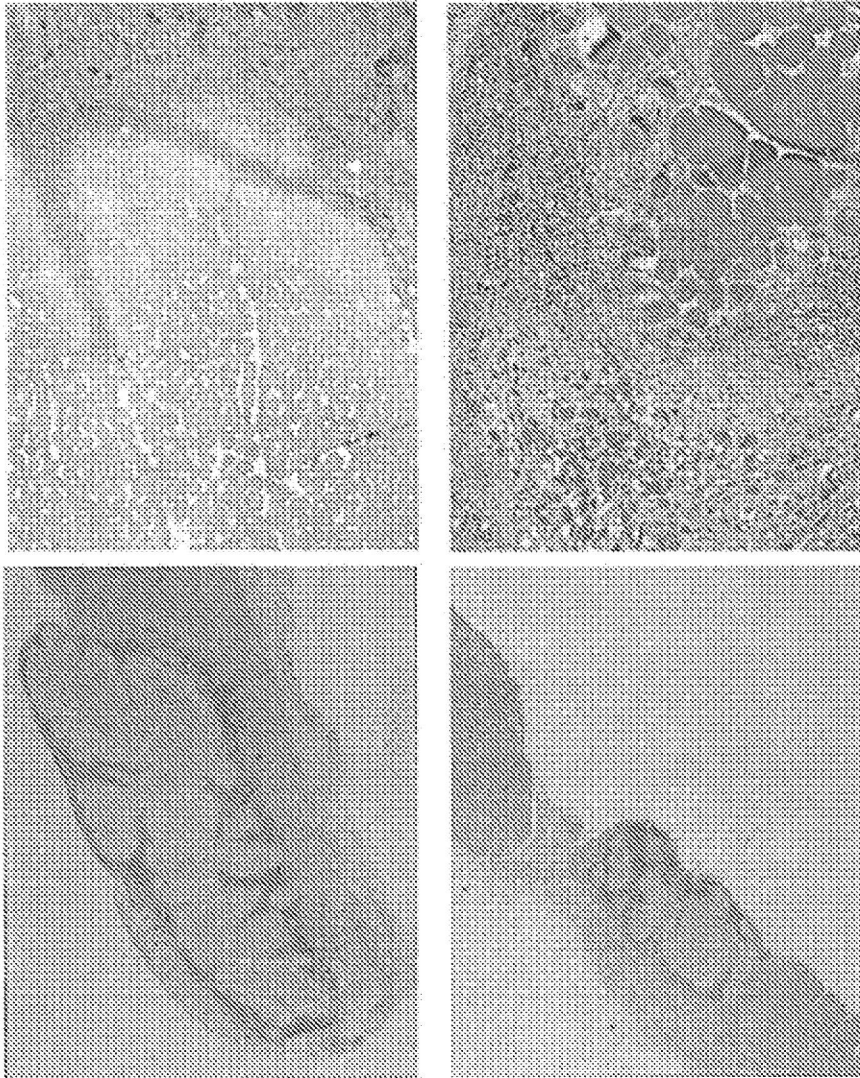


FIG. 4

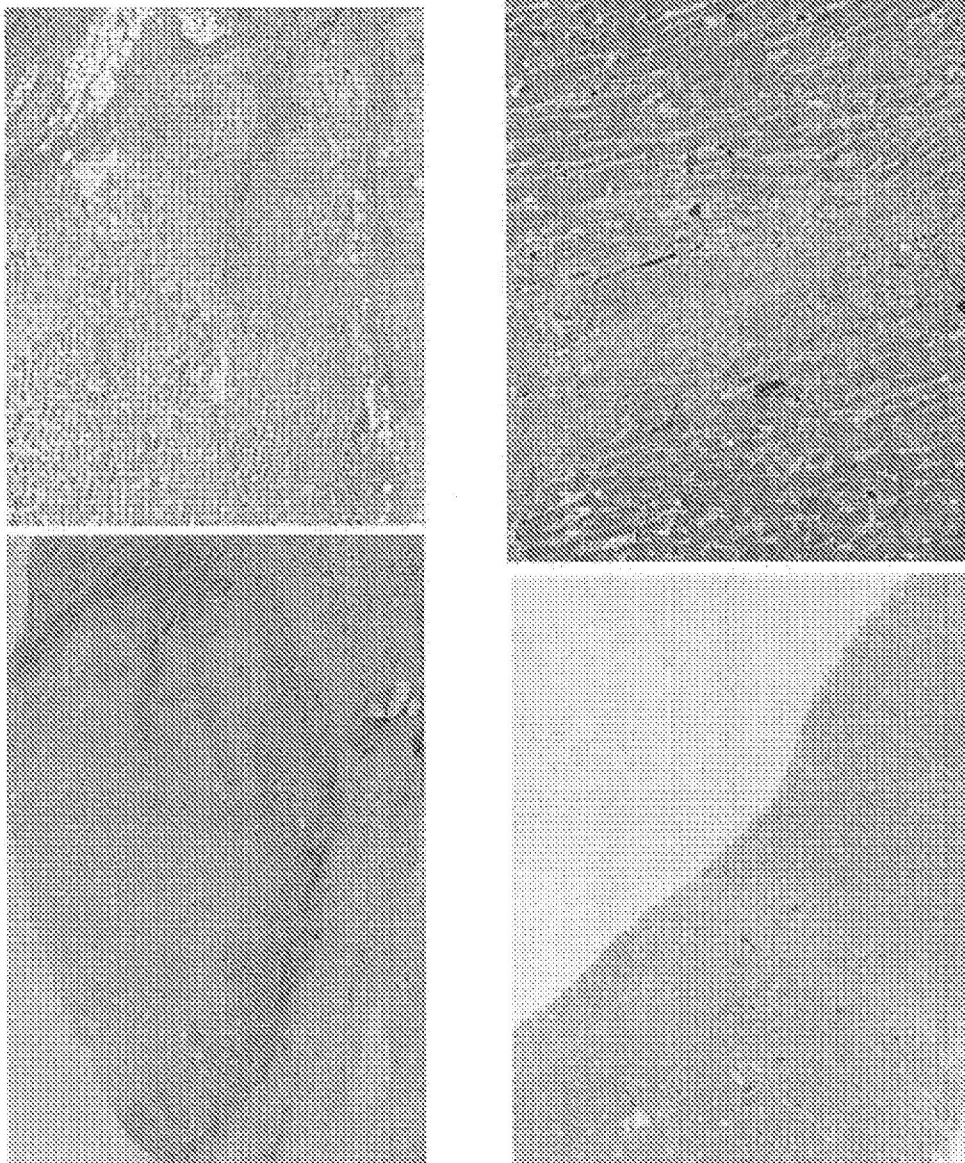


FIG. 5

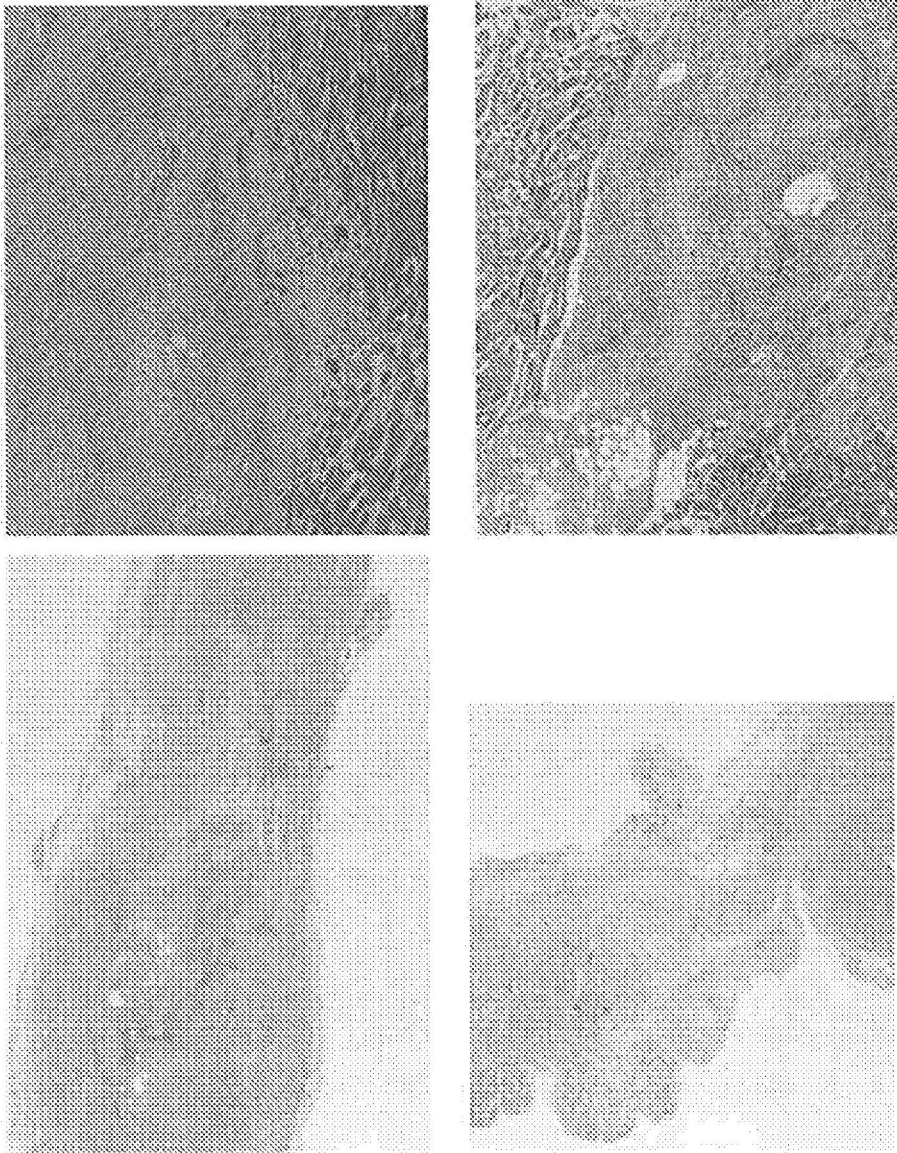


FIG. 6

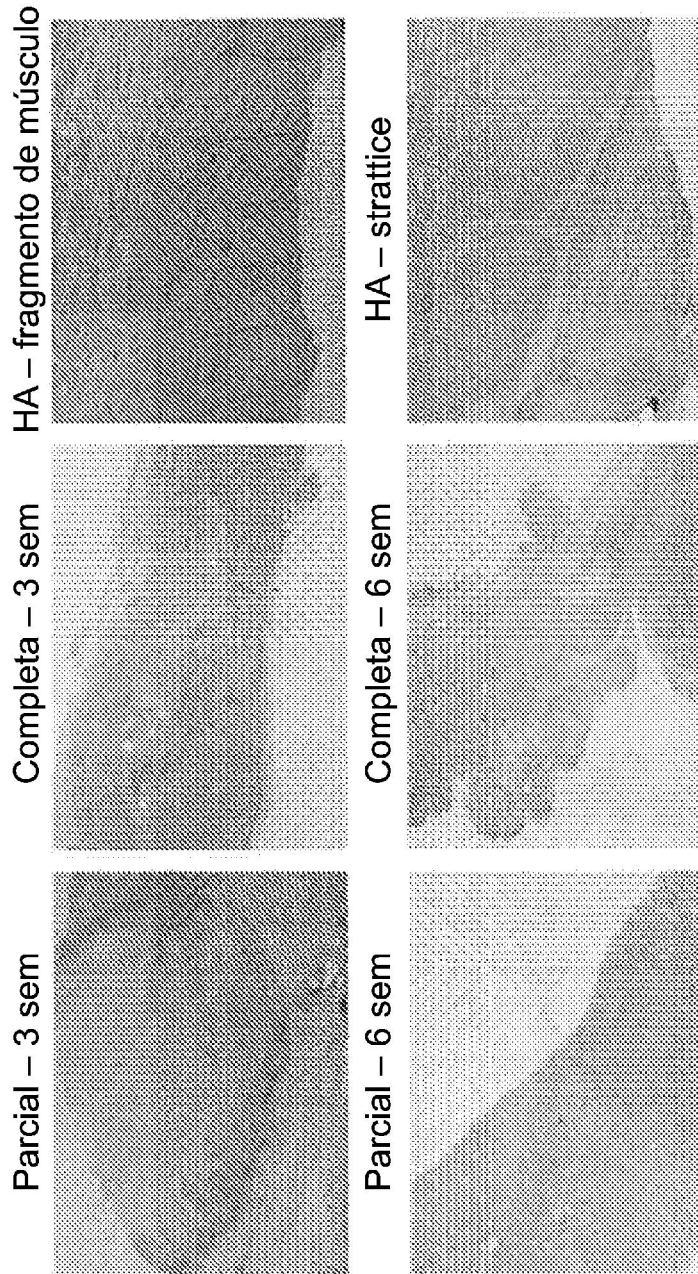


FIG. 7