

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 976 638**

51 Int. Cl.:

**A61L 27/36** (2006.01)

**A61L 27/50** (2006.01)

**A61L 27/52** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.03.2015 E 20170093 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2024 EP 3698815**

54 Título: **Hidrogel esterilizado de modo terminal que proviene de matriz extracelular**

30 Prioridad:

**21.03.2014 US 201461968716 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**06.08.2024**

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF PITTSBURGH- OF THE  
COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER  
EDUCATION (100.0%)  
1st Floor Gardner Steel Conference Center, 130  
Thackeray Avenue  
Pittsburgh PA 15260, US**

72 Inventor/es:

**BADYLAK, STEPHEN F.;  
DEARTH, CHRISTOPHER LEE;  
KEANE, TIMOTHY JOSEPH, JR. y  
TURNER, NEILL JORDON**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

Observaciones:

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

**ES 2 976 638 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

Hidrogel esterilizado de modo terminal que proviene de matriz extracelular

**Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de la la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos n. ° 61/968.716, presentada el 21 de marzo de 2014.

**Antecedentes**

En el presente documento se describen procedimientos de esterilización de geles derivados de matriz extracelular (ECM).

10 La esterilización terminal de los armazones de matriz extracelular (ECM) (por ejemplo, por exposición al gas de óxido de etileno (EtO), irradiación gamma o radiación de haz de electrones) inhibe la formación de un hidrogel que proviene de ECM. Los resultados de los estudios preclínicos han demostrado y continúan mostrando marcados beneficios de los productos de degradación ECM, los cuales se concentran en hidrogeles ECM. Debe identificarse un procedimiento de esterilización de hidrogeles de ECM antes de la traslación clínica y la comercialización generalizada de productos de hidrogel.

15 El documento WO 2013/009595 A2 desvela un procedimiento de fabricación de un material de matriz extracelular (ECM) descelularizado del sistema nervioso central (SNC) que comprende congelar el tejido del SNC, descongelar el tejido, digerir el tejido, incubar el tejido en una solución que comprende un detergente, someter el tejido a choque osmótico incubando el tejido, primero en una solución hipertónica y luego en una solución hipotónica incubando el tejido en una solución que comprende un emulsionante y esterilizar el tejido.

**Resumen**

El alcance de esta invención se define en las reivindicaciones. Cualquier "realización" o "ejemplo" que se describa en la descripción pero que no esté cubierto por las reivindicaciones debe considerarse presentado únicamente a título ilustrativo. Las realizaciones de la descripción relativas a procedimientos de tratamiento no están cubiertas por las reivindicaciones.

25 En el presente documento se describen procedimientos para hacer geles de ECM (no son parte de la invención reivindicada) y composiciones relacionadas. Los geles de ECM no suelen producir geles después de la digestión del material de ECM esterilizado de modo terminal con una proteasa ácida para producir una solución de material digerido, seguida de neutralización y aumento de la temperatura de la solución a 37°C. Aquí se describe una solución a este problema, que permite la esterilización terminal, pero también da como resultado una gelificación reproducible. Los armazones de ECM esterilizados de modo terminal a través de EtO, haz de electrones y radiación gamma en dosis múltiples en una lámina sólida no apoyan la formación de hidrogel. Sin embargo, aquí se muestra que cambiar la forma del material antes de la esterilización de la lámina a un producto digerido liofilizado de ECM es propicio para la formación de hidrogel. Como se muestra en los ejemplos más adelante, por ejemplo y sin limitación, el secado por congelación (liofilización) de un producto digerido de ECM, la esterilización del digerido seco por exposición al gas de óxido de etileno y la reconstitución del pre-gel seco en agua, produce un digerido que se gelifica de forma reproducible cuando se neutraliza y se incuba a 37°C. En base a estos resultados, se espera que la esterilización terminal del digerido seco mediante otras metodologías aceptadas (por ejemplo, radiación de haz de electrones, radiación gamma, rayos X, dióxido de carbono supercrítico) permita de manera similar la formación de un hidrogel de ECM.

40 Se desvelan procedimientos para preparar composiciones de matriz extracelular (ECM) esterilizadas, gelificadas y solubilizadas útiles como armazones de crecimiento celular (que son parte de la invención reivindicada). Las composiciones pueden moldearse antes de la implantación o administrarse a un paciente en una forma no gelificada antes de la gelificación donde la composición gelifica *in situ*. También se proporcionan composiciones preparadas de acuerdo con los procedimientos, así como usos para las composiciones. En una forma de realización se proporciona un dispositivo, tal como una prótesis, que comprende una matriz inorgánica en la que se dispersa la ECM esterilizada, gelificada y solubilizada para facilitar el crecimiento de células en la ECM y, por lo tanto, la adaptación y/o unión del dispositivo a un paciente.

**Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 muestra esquemáticamente una forma de realización de un implante femoral descrito en el presente documento.

50 La figura 2 muestra esquemáticamente una forma de realización de una prótesis de mano descrita en el presente documento.

La figura 3 es un esquema de una vista en sección transversal de la pared de la vejiga urinaria (no dibujada a escala). Se muestran las siguientes estructuras: capa de células epiteliales (A), membrana basal (B), túnica propia

(C), muscularis mucosa (D), túnica submucosa (E), túnica muscularis externa (F), túnica serosa (G), túnica mucosa (H) y el lumen de la vejiga (L).

La figura 4A es una fotografía de la lámina de matriz de vejiga urinaria (UBM) porcina liofilizada.

La figura 4B es una fotografía de polvo de matriz de vejiga urinaria (UBM) porcina liofilizada.

5 La figura 4C es una fotografía de una solución digerida con pepsina a una concentración de 10 mg/ml de UBM.

La figura 4D es una fotografía de geles a 4 mg/ml de UBM y a 8 mg/ml de UBM, donde se muestra un gel de colágeno I (Col I) a 4 mg/ml para la comparación (D).

La figura 5 muestra los resultados de la electroforesis en gel de geles de UBM y Col I.

La figura 6A es una imagen de micrografía electrónica de barrido (SEM) de gel de UBM de 3 mg/ml a 5 000X.

10 La figura 6B es una imagen de micrografía electrónica de barrido (SEM) de gel de UBM de 3 mg/ml a 10 000X.

La figura 6C es una imagen de micrografía electrónica de barrido (SEM) de gel de UBM de 6 mg/ml a 5 000X.

La figura 6D es una imagen de micrografía electrónica de barrido (SEM) de gel de UBM de 6 mg/ml a 10 000X.

La figura 7A es una imagen de SEM de un gel de Col I de 4 mg/ml con un aumento de 5 000X.

La figura 7B es una imagen de SEM de un gel de UBM de 4 mg/ml con un aumento de 5 000X.

15 La figura 8A muestra la cinética de gelificación turbidimétrica de geles de Col I y geles de UBM, que se determinó espectrofotométricamente midiendo la absorbancia durante la gelificación. Los resultados se muestran para los valores medidos de absorbancia.

La figura 8B muestra la cinética de gelificación turbidimétrica de geles de Col I y geles de UBM, que se determinó espectrofotométricamente midiendo la absorbancia durante la gelificación. Los resultados se muestran para valores de absorbancia normalizados, lo que permite calcular parámetros cinéticos como  $t_{1/2}$  (tiempo para alcanzar el 50% de la turbidez máxima),  $t_{lag}$  (tiempo de retraso de la gelificación) y  $S$  (velocidad de gelificación).

20

La figura 9 muestra la cinética de gelificación turbidimétrica de geles de submucosa de intestino delgado (SIS) de 1 mg/ml.

25 La figura 10 muestra mediciones reológicas durante la gelificación de geles de UBM, donde la gelificación se determinó mecánicamente monitoreando los módulos oscilatorios de la muestra a una frecuencia fija durante la gelificación. Se muestran los resultados del módulo elástico ( $G'$ ) y del módulo de viscosidad ( $G''$ ) para gel de UBM de 3 mg/ml y para gel de UBM de 6 mg/ml.

La figura 11 A muestra mediciones reológicas durante la gelificación de los geles LS (estroma hepático) y SIS. La cinética de gelificación se determinó a 5% de tensión y 1 rad/s. Los resultados muestran el módulo elástico ( $G'$ ) para los geles LS, SIS y UBM a 6 mg/ml.

30

La figura 11B muestra mediciones reológicas durante la gelificación de los geles LS (estroma hepático) y SIS. La cinética de gelificación se determinó a 5% de tensión y 1 rad/s. Los resultados muestran que el módulo de almacenamiento ( $G'$ ) en función de la frecuencia angular también se determinó para los geles de LS, UBM y SIS a 6 mg/ml.

35 La figura 12 muestra el efecto de la frecuencia sobre la viscosidad dinámica de gel de Col I de 3 mg/ml, gel de UBM de 3 mg/ml y gel de UBM de 6 mg/ml.

La figura 13A muestra una fotografía digital de una fibra de titanio porosa penetrada con gel de UBM, donde la fibra se trató sin ultrasonido. Las barras de escala son 2000  $\mu\text{m}$ .

40 La figura 13B muestra una fotografía digital de una fibra de titanio porosa penetrada con gel de UBM, donde la fibra se trató con ultrasonido. Las barras de escala son 2000  $\mu\text{m}$ .

La figura 14A muestra una imagen de SEM de un armazón de metal poroso que contiene cables de Ti6Al4V en una malla de fibra.

La figura 14B muestra una imagen de ESEM del armazón híbrido ECM/metal poroso, donde el gel de UBM reviste ambos cables Ti6Al4V.

45 La figura 14C muestra una imagen de SEM de un armazón de metal poroso que contiene cuentas de titanio comercialmente puro sinterizado (CP Ti).

La figura 14D muestra una imagen de ESEM del almacén híbrido ECM/metal poroso y las cuentas de CP Ti después de la exposición a ultrasonido.

5 La figura 15 muestra una observación cualitativa de la formación de hidrogel siguiente a la esterilización terminal. En comparación con los controles no esterilizados, se abolió la capacidad de la ECM dérmica para formar un hidrogel siguiente a la esterilización terminal después de que se retiraron los moldes de anillo metálico (imagen superior).

La figura 16A muestra pre-gel liofilizado no esterilizado.

La figura 16B muestra pre-gel liofilizado no esterilizado reconstituido en HCl

La figura 16C muestra un pre-gel liofilizado no esterilizado reconstituido en agua desionizada.

10 La figura 16D muestra un pre-gel liofilizado esterilizado con EtO y reconstituido en agua o HCl. La comparación de la figura 16B-C muestra que la reconstitución fue completa para todas las muestras excepto aquellas después de la esterilización en HCl (Figura 16D).

La figura 17 muestra la esterilización de pre-gel liofilizado de SIS-ECM en la formación de hidrogel.

La figura 18 muestra la esterilización de pre-gel liofilizado de UBM en la formación de hidrogel.

15 La figura 19A es una comparación de diversos procedimientos de esterilización de UBM descelularizada.

La figura 19B es una comparación cualitativa de la figura 19A.

#### Descripción detallada

20 El uso de valores numéricos en los diversos intervalos especificados en esta solicitud, a menos que se indique expresamente lo contrario, se indica como aproximaciones como si los valores mínimos y máximos dentro de los intervalos establecidos estén precedidos por la palabra "aproximadamente". De esta manera, se pueden usar ligeras variaciones por encima y por debajo de los intervalos indicados para lograr sustancialmente los mismos resultados que los valores dentro de los intervalos. Además, a menos que se indique lo contrario, la divulgación de los intervalos tiene como propósito indicar un intervalo continuo que incluya todos los valores entre los valores mínimo y máximo. Como se usa en el presente documento, el artículo indefinido "un" se refiere a uno o más.

25 Como se usa en el presente documento, el término "que comprende" es no concluyente (con final abierto) y puede ser sinónimo de "que incluye", "que contiene" o "caracterizado por". El término "que consiste esencialmente en" limita el alcance de una reivindicación a los materiales o etapas especificados y a aquellos que no afectan materialmente la(s) característica(s) básica(s) y nueva(s) de la invención reivindicada. El término "que consiste en" excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente no especificados en la reivindicación. Como se usa en el presente documento, las formas de realización "que comprenden" uno o más elementos o etapas indicados también incluyen, pero no se limitan a formas de realización "que consisten esencialmente en" y "que consisten" en estos elementos o etapas indicados.

30 Los procedimientos (que no son parte de la invención reivindicada) se describen en la presente memoria para preparar composiciones derivadas de matriz extracelular (ECM) que comprenden matriz extracelular solubilizada obtenida de cualquiera de una variedad de tejidos. Se describen composiciones relacionadas y dispositivos y procedimientos de uso (que no forman parte de la invención reivindicada). Las composiciones son de gelificación inversa, lo que significa que la viscosidad de la matriz aumenta cuando se calienta por encima de la temperatura de solución crítica más baja (LCST) de la composición a temperaturas fisiológicas cercanas a aproximadamente 37°C. Según una forma de realización no limitativa, la composición derivada de ECM es una solución inyectable a temperaturas inferiores a 37°C, pero un gel a una temperatura fisiológica de 37°C. Según ciertas formas de realización, el gel es bioactivo porque toda la ECM intacta se solubiliza y no se dializa, reticula y/o trata de otra manera para eliminar o desactivar los componentes estructurales o funcionales de la ECM, lo que da como resultado un almacén de gel altamente bioactivo. Se proporciona un conjunto general de principios para preparar un gel que proviene de ECM junto con protocolos específicos para preparar geles de numerosos tejidos, incluyendo vejiga urinaria, bazo, hígado, corazón, páncreas, ovario, intestino delgado, intestino grueso, colon, sistema nervioso central (SNC), tejido adiposo y hueso. Ejemplos no limitativos de composiciones derivadas de ECM de gelificación inversa se describen en la patente de Estados Unidos No. 8,361,503, y en la publicación de patente de Estados Unidos No.2010-0226895, y en las publicaciones internacionales de patente No. WO 2011/087743, WO 2013/009595 y WO 2013/009595.

35 Como se usa en el presente documento, "esterilización terminal" o "esterilizado de modo terminal" se refiere a la esterilización esencialmente o prácticamente completa de una composición o dispositivo. Esto no incluye la desinfección, por ejemplo, con ácido peracético durante la preparación de un producto de ECM como parte o complemento de la descelularización. Por ejemplo, una composición de ECM puede desinfectarse por inmersión en ácido peracético ( $\sigma$ ) al 0,1% (v/v), etanol al 4% (v/v) y agua estéril al 96% (v/v) durante 2 h. El material de ECM se lava luego dos veces durante 15 minutos con PBS (pH = 7,4) y dos veces durante 15 minutos con agua desionizada. Aunque esto se caracteriza como desinfección, generalmente no es aceptable bajo la práctica reguladora actual como

procedimiento de esterilización terminal. Durante la esterilización terminal, los productos están expuestos a un procedimiento validado que mata a los microorganismos vivos. En el contexto de los productos de ECM, el material de ECM des-celularizado puede exponerse a la esterilización terminal antes de la solubilización, almacenamiento y/o distribución comercial. En la técnica se conoce una variedad de procedimientos para la esterilización terminal, incluida la exposición a: óxido de etileno, óxido de propileno, radiación gamma, radiación de haz de electrones, esterilización por plasma de gas y dióxido de carbono supercrítico (véase, por ejemplo, White, A, et al, "Esterilización terminal efectiva utilizando dióxido de carbono supercrítico" (2006) J. Biotech. 123(4):504-515).

La composición también se puede desinfectar por medio de tratamiento con glutaraldehído, lo que provoca la reticulación del material proteico, pero este tratamiento altera sustancialmente el material de forma que se reabsorbe lentamente o no se reabsorbe en absoluto e incita un tipo diferente de remodelación del huésped que se parece más a la formación de tejido cicatricial o encapsulación que a la remodelación constructiva. La reticulación del material proteico también puede inducirse con carbodiimida o procedimientos des-hidrotérmicos o de fotooxidación. El material de ECM reticulado no se considera ECM intacta para los fines del presente documento.

Como se indica en los ejemplos más adelante, el momento de la esterilización terminal afecta sustancialmente la capacidad de un material de ECM solubilizado y digerido para formar un hidrogel por medio de gelificación inversa. La esterilización se realiza en una composición de ECM seca, digerida con proteasa ácida. Por "seco" o "secado" se entiende seco o liofilizado hasta el punto de que esencialmente toda el agua se elimina de una composición, reconociendo que, en la práctica, uno no puede eliminar literalmente todas las moléculas de agua de ninguna composición. Así, "seco" o "secado" se refiere a un contenido de agua de, por ejemplo y sin limitación, menos de 5,0, 1,0, 0,5, 0,1, 0,01, 0,001 o 0,0001 % en peso de la composición (% en peso). El material puede secarse mediante cualquier procedimiento como, por ejemplo y sin limitación, por evaporación simple a cualquier temperatura no dañina, como a temperatura ambiente, o por liofilización (secado por congelación).

Además, se proporciona un procedimiento para preparar un gel derivado de matriz extracelular en el contexto de un producto obtenible por dicho p. En el procedimiento, la matriz extracelular (ECM), por ejemplo, la ECM intacta, se solubiliza por digestión con una proteasa ácida como la tripsina o la pepsina en una solución ácida para producir una solución de material digerido. La solución de material digerido se seca, por ejemplo, mediante secado al aire o liofilización. Una vez que la solución se seca, se esteriliza de modo terminal, por ejemplo, mediante haz de electrones o radiación gamma, exposición al gas de óxido de etileno o dióxido de carbono supercrítico. La composición puede almacenarse, envasarse y/o distribuirse en este estado seco, por ejemplo, liofilizado. Luego, el material esterilizado se hidrata, por ejemplo, por solubilización en agua o en una solución acuosa como un regulador de pH TRIS o PBS, o una solución salina como una solución de cloruro de sodio, tal como solución salina (0,9%) para producir una solución de material digerido esterilizado. La solución de material digerido esterilizado se lleva a un pH entre 7,2 y 7,8 para producir una solución neutralizada de material digerido, por ejemplo, mezclando la solución con un regulador de pH isotónico o una base tal como, sin limitación, NaOH. La solución gelifica a una temperatura superior a 25°C. La rehidratación, neutralización y opcionalmente la etapa de gelificación se pueden combinar rehidratando la composición esterilizada y seca en un regulador de pH como PBS a pH 7,2-7,8, que llevará a cabo la etapa de rehidratación y neutralización al mismo tiempo; y si la solución de rehidratación es superior a 25°C, la solución comienza a gelificarse. Puede ser deseable mantener la temperatura a menos de 20-25°C para controlar el procedimiento de gelificación y rehidratar la composición de manera más uniforme.

Las composiciones descritas en la presente memoria encuentran uso como, sin limitación, un injerto inyectable (por ejemplo, xenogénico, alogénico o autólogo) para tejidos; por ejemplo, tejidos óseos o blandos, que necesitan reparación o aumento de forma más típica para corregir defectos de tejidos inducidos por traumas o por enfermedades. Las composiciones también pueden usarse como un material de carga para construcciones de implantes que comprenden, por ejemplo, una construcción moldeada que se ha llevado a una forma deseada para uso en procedimientos quirúrgicos cosméticos o de tratamiento de traumatismos.

Las composiciones pueden implantarse en un paciente, humano o animal, por medio de una cantidad de procedimientos. Las composiciones pueden inyectarse en forma líquida en el lugar deseado del paciente. Como se usa en el presente documento, el término "semilla", "siembra" o "sembrado" se refiere a la adición, incorporación, propagación o difusión de un volumen definido de una suspensión celular o un número definido de células a una composición específica. La composición se puede sembrar previamente con células, y luego inyectarse preferentemente mediante el uso de un orificio más grande, por ejemplo, de aguja calibre 16, para evitar el cizallamiento de las células. En otra forma alternativa, la composición se gelifica dentro de un molde, y el producto moldeado gelificado se implanta luego en el paciente en un sitio deseado. El producto moldeado gelificado se puede sembrar previamente (depositar sobre el gel moldeado o mezclar durante la gelificación) con células, tales como células del paciente.

Como se usa en el presente documento, los términos "matriz extracelular" y "ECM" se refieren a un armazón natural para el crecimiento celular que se prepara por medio de la descclularización de tejido encontrado en organismos multicelulares, tales como mamíferos y humanos. La ECM puede tratarse adicionalmente mediante, por ejemplo, diálisis o reticulación. La ECM es una mezcla compleja de biomoléculas estructurales y no estructurales que incluye, entre otros, colágenos, elastinas, lamininas, glicosaminoglicanos, proteoglicanos, antimicrobianos, quimio-atrayentes, citoquinas y/o factores de crecimiento. En los mamíferos, la ECM a menudo comprende alrededor del 90% de

colágeno, en sus diversas formas. La composición y estructura de las ECM varían dependiendo de la fuente del tejido. Por ejemplo, la ECM de la submucosa del intestino delgado (SIS), de la matriz de la vejiga urinaria (UBM) y del estroma hepático difieren, cada una en su estructura y composición general debido al nicho celular único necesario para cada tejido.

5 Como se usa en este documento, los términos "matriz extracelular intacta" y "ECM intacta" se refieren a una matriz extracelular que retiene la actividad de sus biomoléculas estructurales y no estructurales, que incluyen, pero no se limitan a, colágenos, elastinas, lamininas, glicosaminoglicanos, proteoglicanos, antimicrobianos, quimio-atrayentes, citoquinas y/o factores de crecimiento tales como, sin limitación, ECM trituradas, como se describe en el presente documento. La actividad de las biomoléculas dentro de la ECM puede eliminarse química o mecánicamente, por ejemplo, mediante reticulación y/o diálisis de la ECM. La ECM intacta esencialmente no ha sido reticulada y/o dializada, lo que significa que la ECM no se ha sometido a diálisis y/o un procedimiento de reticulación, ni a otras condiciones que no sean procedimientos que ocurren naturalmente durante el almacenamiento y manejo de ECM antes de solubilización, como se describe en el presente documento. Por lo tanto, la ECM que está sustancialmente reticulada y/o dializada (de cualquier forma, que no sea trivial y que no afecte sustancialmente la gelificación y las características funcionales de la ECM en sus usos descritos aquí) no se considera "intacta".

Por "biocompatible" se entiende que un dispositivo, composición de armazón, etc. es esencialmente, prácticamente (para su uso previsto) y/o sustancialmente no tóxico, que no daña o no inhibe, o no inhibidor de, células, tejidos, órganos y/o sistemas de órganos que entrarían en contacto con el dispositivo, armazón, composición, etc.

En general, el procedimiento de preparación de un gel que proviene de ECM requiere el aislamiento de ECM de un animal de interés y de un tejido u órgano de interés. En ciertas formas de realización, la ECM se aísla del tejido de mamífero. Como se usa en el presente documento, el término "tejido de mamífero" se refiere al tejido que proviene de un mamífero, en donde el tejido comprende cualquier componente celular de un animal. Por ejemplo y sin limitación, el tejido puede provenir de agregados de células, un órgano, porciones de un órgano o combinaciones de órganos. En ciertas formas de realización, la ECM se aísla de un animal vertebrado, por ejemplo y sin limitación, humano, mono, cerdo, ganado vacuno y ovino. En ciertas formas de realización, la ECM se aísla de cualquier tejido de un animal, por ejemplo y sin limitación, vejiga urinaria, hígado, SNC, tejido adiposo, intestino delgado, intestino grueso, colon, esófago, páncreas, dermis y corazón. En una forma de realización, la ECM proviene de una vejiga urinaria. La ECM puede o no incluir la porción de membrana basal de la ECM. En ciertas formas de realización, la ECM incluye al menos una porción de la membrana basal. La ECM puede retener o no algunos de los elementos celulares que componen el tejido original, como las células endoteliales capilares o los fibrocitos.

Como se usa en el presente documento, el término "provenir" y cualquier otra forma de palabra de cognados de los mismos, tales como, sin limitación, "que proviene de" y "proveniente de" se refiere a un componente o componentes obtenidos de cualquier fuente indicada por medio de cualquier procedimiento útil. Por ejemplo y sin limitación, un gel que proviene de ECM se refiere a un gel compuesto por componentes de ECM obtenidos de cualquier tejido mediante cualquier número de procedimientos conocidos en la técnica para aislar ECM. En otro ejemplo, la ECM derivada de tejido de mamífero se refiere a la ECM compuesta por componentes de tejido de mamífero obtenidos de un mamífero mediante cualquier procedimiento útil.

Después del aislamiento del tejido de interés, la descélularización se realiza por medio de diversos procedimientos, por ejemplo y sin limitación, exposición a solución salina hipertónica, ácido peracético, Triton-X u otros detergentes. La ECM descélularizada se puede secar, liofilizar (secar por congelación) o secar al aire. La ECM seca se puede triturar mediante procedimientos que incluyen, entre otros, desgarrar, molienda, corte, pulverización y cizallamiento. La ECM triturada también puede convertirse en polvo mediante procedimientos, por ejemplo y sin limitación, tales como pulverización o molienda en un estado congelado o liofilizado.

Como se usa en el presente documento, el término "triturar" y cualquier otra forma de palabra o cognados de los mismos como, sin limitación, "trituración" y "triturando", se refieren al procedimiento de reducción de partículas más grandes en partículas más pequeñas, que incluye, sin limitación, pulverización, mezcla, trozado, rebanado, molienda, corte, trozado. La ECM se puede triturar en cualquier forma, incluidas, entre otras, formas hidratadas, congeladas, secadas al aire, liofilizadas, pulverizadas, formas de lámina.

A fin de preparar el tejido de ECM solubilizado, la ECM triturada se digiere con una proteasa ácida en una solución ácida para formar una solución de material digerido. Como se usa en el presente documento, el término "proteasa ácida" se refiere a una enzima que escinde enlaces peptídicos, en donde la enzima tiene una actividad aumentada de escisión de enlaces peptídicos en un pH ácido. Por ejemplo y sin limitación, las proteasas ácidas pueden incluir pepsina y tripsina.

La solución de material digerido de ECM generalmente se mantiene en agitación constante durante un cierto tiempo a temperatura ambiente. El digerido de ECM puede usarse inmediatamente o almacenarse a -20°C o congelarse a, por ejemplo y sin limitación, -20°C o -80°C, y en el contexto de los procedimientos y composiciones descritos en este documento, puede secarse y esterilizarse. A continuación, el pH de la solución de material digerido se eleva a un pH entre 7,2 y 7,8 para producir una solución de material digerido neutralizado. El pH puede elevarse agregando una o más de una base o una solución isotónica con pH regulado, por ejemplo y sin limitación, NaOH o PBS a pH 7,4. El

procedimiento típicamente no incluye una etapa de diálisis antes de la gelificación, lo cual da lugar a una matriz similar a ECM más completa que típicamente gelifica a 37°C más lentamente que las preparaciones de colágeno o de ECM dializadas comparables. Por lo tanto, el gel está más dispuesto para inyección en un paciente, y también retiene más de las cualidades de la ECM nativa debido a la retención de muchos factores solubles nativos tales como, sin limitación, las citoquinas. Es inesperada la capacidad de las preparaciones no dializadas (ECM completa), preparadas a partir de una variedad de tejidos para gelificar con una cinética adecuada para su uso en moldes o *in situ*.

Como se usa en el presente documento, el término "solución isotónica con pH regulado" se refiere a una solución isotónica que tiene pH regulado entre 7,2 y 7,8 y que tiene una concentración equilibrada de sales para promover un entorno isotónico. Como se usa en el presente documento, el término "base" se refiere a cualquier compuesto o una solución de un compuesto con un pH superior a 7. Por ejemplo y sin limitación, la base es un hidróxido alcalino o una solución acuosa de un hidróxido alcalino. En ciertas formas de realización, la base es NaOH o NaOH en PBS.

Esta solución de material digerido neutralizado puede, en ese momento, incubarse a una temperatura adecuadamente cálida, por ejemplo y sin limitación, a aproximadamente 37°C para gelificar. La solución de material digerido neutralizado se puede congelar y almacenar, por ejemplo y sin limitación, a -20°C o -80°C. Como se usa en el presente documento, el término "solución de material digerido neutralizado" o "material digerido neutralizado" se refiere a un material digerido o solución de material digerido en el que el pH aumenta y puede estar en forma de una solución o de composición seca. Por ejemplo y sin limitación, un material digerido neutralizado tiene un pH entre 7,2 y 7,8.

Puede usarse cualquier tipo de tejido de matriz extracelular en los procedimientos, composiciones y dispositivos como se describen en el presente documento (véanse en general los documentos patente de los Estados Unidos número 4,902,508; 4,956,178; 5,281,422; 5,352,463; 5,372,821; 5,554,389; 5,573,784; 5,645,860; 5,711,969; 5,753,267; 5,762,966; 5,866,414; 6,099,567; 6,485,723; 6,576,265; 6,579,538; 6,696,270; 6,783,776; 6,793,939; 6,849,273; 6,852,339; 6,861,074; 6,887,495; 6,890,562; 6,890,563; 6,890,564; y 6,893,666), siempre y cuando el material no esté esterilizado de modo terminal. En ciertas formas de realización, la ECM se aísla de un animal vertebrado, por ejemplo y sin limitación, de un animal vertebrado mamífero de sangre caliente que incluye, pero no se limita a, humano, mono, cerdo, vaca y oveja. La ECM puede derivarse de cualquier órgano o tejido, que incluyen, entre otros, vejiga urinaria, intestino, hígado, esófago y dermis. En una forma de realización, la ECM se aísla de una vejiga urinaria. En otra forma de realización, la ECM se aísla del intestino, o una porción del mismo. El intestino se extiende desde el esfínter pilórico hasta el ano e incluye: el intestino delgado, que se extiende desde la válvula pilórica hasta la válvula ileocecal; el intestino grueso, que se extiende desde la válvula ileocecal; y porciones de los mismos, que incluyen el duodeno; el yeyuno; el íleon; el ciego; el apéndice; el colon ascendente, transversal, descendente y sigmoideo; el recto y/o el canal anal (véase, por ejemplo, Marieb, EN, Human Anatomy and Physiology, Segunda edición, 1992, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., Redwood City, California, págs. 792, 793, 802, y 803). La ECM puede o no incluir la porción de membrana basal de la ECM. En ciertas formas de realización, la ECM incluye al menos una porción de la membrana basal.

El tipo de ECM utilizado en el armazón puede variar dependiendo de los tipos de células que se pretendan reclutar durante la curación de heridas o la regeneración de tejidos, la arquitectura del tejido nativo del órgano de tejido a reemplazar, la disponibilidad de la fuente de tejido de ECM u otros factores que afectan la calidad del armazón final y la posibilidad de fabricar el armazón. Por ejemplo y sin limitación, la ECM puede contener tanto una superficie de membrana basal, como una superficie de membrana no basal, lo que sería útil para promover la reconstrucción de tejidos como la vejiga urinaria, el esófago o los vasos sanguíneos, todos los cuales tienen un componente de membrana basal y de membrana no basal.

En una forma de realización no limitante, la ECM se cosecha de vejigas urinarias porcinas (también conocida como matriz de vejiga urinaria o UBM). Brevemente, la ECM se prepara retirando el tejido de la vejiga urinaria de un cerdo y recortando los tejidos conectivos externos residuales, que incluye el tejido adiposo. Toda la orina residual se elimina mediante lavados repetidos con agua corriente. El tejido se deslaminar remojándolo primero en una solución de des-epitelización, por ejemplo y sin limitación, solución salina hipertónica (por ejemplo, solución salina de 1,0 N), por períodos de tiempo que van desde diez minutos a cuatro horas. La exposición a solución salina hipertónica elimina las células epiteliales de la membrana basal subyacente. Opcionalmente, se puede agregar un agente quelante de calcio a la solución salina. El tejido que queda después del procedimiento de delaminación inicial incluye la membrana basal epitelial y las capas de tejido abluminales a la membrana basal epitelial. A continuación, este tejido se somete a un tratamiento adicional para eliminar la mayoría de los tejidos abluminales, pero mantienen la membrana basal epitelial y la túnica propia. La serosa externa, la adventicia, la mucosa de túnica muscular, la túnica submucosa y la mayor parte de la mucosa muscularis se eliminan del tejido des-epitelizado restante por abrasión mecánica o mediante una combinación de tratamiento enzimático (por ejemplo, usando tripsina o colagenasa) seguido de hidratación y abrasión. La eliminación mecánica de estos tejidos se logra mediante la eliminación de los tejidos mesentéricos con, por ejemplo y sin limitación, fórceps Adson-Brown y tijeras Metzenbaum y limpiando la túnica muscular y la túnica submucosa utilizando un movimiento de limpieza longitudinal con un mango de bisturí u otro objeto rígido envuelto en gasa humedecida. También se contemplan procedimientos robóticos automatizados que implican cuchillas de corte, láseres y otros procedimientos de separación de tejidos. Después de que se eliminan estos tejidos, la ECM resultante consiste principalmente en la membrana basal epitelial y la túnica propia subyacente (capas B y C de la figura 3).

En otra forma de realización, la ECM se prepara raspando el tejido de la vejiga porcina para eliminar las capas externas, que incluyen la túnica serosa y la túnica muscular (capas G y F en la figura 3) mediante el uso de un movimiento de limpieza longitudinal con un mango de bisturí y una gasa humedecida. Después de la eversión del segmento de tejido, la porción luminal de la túnica mucosa (capa H en la figura 3) se deslaminada del tejido subyacente utilizando el mismo movimiento de limpieza. Se debe tener cuidado para evitar la perforación de la submucosa (capa E de la figura 3). Después de que se eliminan estos tejidos, la ECM resultante consiste principalmente en la túnica submucosa (capa E de la figura 3).

Una gran cantidad de preparaciones de ECM están disponibles comercialmente, preparadas por medio de numerosos procedimientos. Las preparaciones de submucosa del intestino delgado (SIS) disponibles comercialmente incluyen, entre otras, Surgisis™, Surgisis-ES™, Stratisis™ y Stratisis-ES™ (Cook Urological Inc.; Indianápolis, Indiana) y GraftPatch™ (Organogenesis Inc.; Cantón Massachusetts). Las preparaciones para la dermis disponibles comercialmente incluyen, entre otras, Pelvicol™ (vendido como Permacol™ en Europa; Bard, Covington, GA), Repliform™ (Microvasive; Boston, Massachusetts) y Alloderm™ (LifeCell; Branchburg, Nueva Jersey). Las preparaciones de vejiga urinaria disponibles comercialmente incluyen, entre otras, UBM (Acell Corporation; Jessup, Maryland). Cualquiera de estas preparaciones de ECM puede proporcionarse potencialmente en una forma que no esté esterilizada de modo terminal y, por lo tanto, pueden ser un precursor adecuado para los procedimientos y composiciones descritos en este documento.

Las composiciones descritas en el presente documento pueden usarse de varias maneras o formas. Por ejemplo y sin limitación, de acuerdo con una primera realización, el material digerido neutralizado se coloca en un molde adecuado para modelar un órgano o una porción del mismo. Como ejemplo no limitativo, la composición se moldea en una porción de hígado para facilitar el nuevo crecimiento del tejido hepático. En otro ejemplo no limitativo, la composición se moldea en forma de cartílago de la nariz o del oído, o una porción del mismo, para reemplazar el tejido cartilaginoso dañado o extirpado. En otro ejemplo no limitativo, la composición se moldea en forma de herida para facilitar la curación de ese tejido sin cicatrices. Para preparar el gel moldeado, el material digerido neutralizado se coloca en un molde biocompatible y preferiblemente estéril, como un molde de plástico, y se incuba a una temperatura y durante un tiempo adecuado para la gelificación de la composición, por ejemplo y sin limitación, a aproximadamente 37 °C. En una forma de realización, la composición y el molde se colocan en una incubadora a 37 °C para gelificar. Debido a que se ha encontrado que el CO<sub>2</sub> ralentiza la gelificación, en una forma de realización no limitante, no se inyecta CO<sub>2</sub> en la incubadora, aunque en otra forma de realización, pueden usarse CO<sub>2</sub> y/o temperatura para controlar el procedimiento de gelificación.

Cualquier citoquina, quimio-atrayente o célula que sean útiles se pueden mezclar en la composición antes de la gelificación o pueden difundirse, absorberse y/o adsorberse en el gel después de gelificar. Por ejemplo y sin limitación, los componentes útiles incluyen factores de crecimiento, interferones, interleucinas, quimiocinas, monocinas, hormonas, factores angiogénicos, fármacos y antibióticos. Las células se pueden mezclar en el gel neutralizado y solubilizado o se pueden colocar encima de la composición moldeada una vez que se gelifica. En cualquier caso, cuando el gel se siembra con células, las células pueden cultivarse y/o adaptarse al nicho creado por el gel de ECM moldeado mediante incubación en un medio adecuado en un biorreactor o incubadora durante un período de tiempo adecuado para preparar de modo óptimo/favorable la composición para la implantación en un paciente. La composición moldeada se puede sembrar con células para facilitar el crecimiento interno, la diferenciación y/o la adaptación de las células. Por ejemplo y sin limitación, las células pueden ser autólogas o alogénicas con respecto al paciente para recibir la composición/dispositivo que comprende el gel. Las células pueden ser células madre u otras células progenitoras, o células diferenciadas. En un ejemplo, una capa de dermis obtenida del paciente se siembra en un molde, para usar en la reparación de piel dañada y/o tejido subyacente.

Como se usa en este documento, el término "molde" se refiere a una cavidad o superficie usada para formar el gel en una forma tridimensional. Por ejemplo y sin limitación, el molde puede ser una placa de pozo, un plato de cultivo celular o un tubo o puede tener una forma útil cualquiera. En una determinada realización, el molde puede conformarse en un determinado órgano o parte de un órgano. El gel puede administrarse al molde en una variedad de procedimientos que incluyen, entre otros, inyección, deposición.

Como se usa en el presente documento, los términos "fármaco" y "fármacos" se refieren a cualquier composición que tenga un efecto preventivo o terapéutico que incluyen sin limitación, antibióticos, péptidos, hormonas, moléculas orgánicas, vitaminas, suplementos, factores, proteínas y quimio-atrayentes.

Como se usa en el presente documento, los términos "célula" y "células" se refieren a cualquier tipo de células de cualquier animal, tales como, sin limitación, ratas, ratones, monos y humanos. Por ejemplo y sin limitación, las células pueden ser células progenitoras, como las células madre, o células diferenciadas, como las células endoteliales, las células del músculo liso. En ciertas formas de realización, las células para procedimientos médicos pueden obtenerse del paciente para procedimientos autólogos o de otros donantes para procedimientos alogénicos.

Un aspecto favorable del uso de tejido premoldeado es que se puede producir una composición en capas. Por ejemplo, una porción central de la composición a implantar puede prepararse con un primer gel de la ECM, obtenido de una primera fuente, y una capa circundante puede ser con un segundo gel de la ECM, obtenido de una segunda fuente

diferente del primero, o la misma fuente que el primero, pero que contiene diferentes componentes, como las citoquinas o las células.

En otra forma de realización de la composición premoldeada, el gel de la ECM está contenido dentro de una vaina laminar de tejido ECM no triturado y no digerido, tal como SIS o UBM, para agregar fuerza física al gel. En esta forma de realización, las láminas de tejido de ECM, preparadas de cualquier manera conocida en la técnica, se pueden colocar en el molde antes de llenar el molde con el tejido de ECM solubilizado para producir el gel. Las láminas de tejido de ECM pueden usarse como molde, siempre que estén formadas y cosidas o reticuladas en la forma deseada. De esta manera, se puede producir una composición sólida que tenga una mayor resistencia física que en el caso de un gel, solo.

La composición puede inyectarse como una solución neutralizada de digestión en un paciente. La composición se inyecta en un lugar en el paciente donde se necesita la matriz para el crecimiento celular. Por ejemplo y sin limitación, cuando a un paciente se le ha extirpado tejido debido a un traumatismo, desbridamiento y/o extracción de tejido dañado, enfermo o canceroso, la composición puede inyectarse en el sitio de extracción de tejido para facilitar el crecimiento del tejido. La viscosidad del pre-gel puede controlarse variando las cantidades de agua (por ejemplo, variando las cantidades de agua, ácido, base, regulador de pH (como PBS) u otros diluyentes) utilizados para preparar el pre-gel. En las aplicaciones en las que se usa una aguja de calibre pequeño, como en la endoscopia, se necesitaría un pre-gel menos viscoso, lo que generalmente da lugar a un gel menos viscoso, una vez que el pre-gel está gelificado. En aplicaciones en las que hay disponible una aguja de mayor calibre, se puede usar un gel más viscoso, con mayor resistencia cuando se gelifica. Además, el uso de una aguja de mayor calibre, independientemente de la viscosidad del pre-gel, favorece la mezcla de células vivas con el pre-gel inmediatamente antes de la implantación con menos riesgo de cizallamiento de las células.

En una forma de realización, se prepara una solución de material digerido neutralizado elevando el pH de la solución de material digerido ácida y la composición se inyecta directamente en un paciente antes de que continúe la gelificación significativa. En una forma de realización, la composición está en estado congelado y se descongela y calienta antes de la inyección. En otra forma de realización, la solución de material digerido ácida se calienta a temperatura fisiológica y se mezcla durante la inyección en un mezclador estático con cantidades adecuadas de una base y/o regulador de pH, tal como PBS. Los mezcladores estáticos adecuados incluyen, sin limitación, mezcladores estáticos helicoidales o cuadrados, disponibles comercialmente de Cammda Corporation de Cobourg, Ontario, Canadá o una jeringa mini-dual con mezclador Micro Static, disponible comercialmente en Plas-Pak Industries, Inc. de Norwich, Connecticut.

Se desvela un kit comercial (que no forma parte de la invención reivindicada) que comprende una composición descrita en el presente documento. Un kit comprende material de embalaje adecuado y la composición. En una forma de realización no limitativa, el kit comprende una solución de material digerido en un recipiente, que puede ser el envase, o que puede estar contenido dentro del envase. En esta forma de realización, si se neutraliza la solución de material digerido, puede congelarse, enfriarse; por ejemplo, se mantiene a temperaturas cercanas al punto de congelación como, sin limitación, por debajo de aproximadamente 4°C o se mantiene a temperatura ambiente, por ejemplo, 20-25°C. En otra forma de realización no limitante, el kit comprende un primer recipiente que contiene una solución ácida que contiene un material digerido de pre-neutralización como se describe en el presente documento, y un segundo recipiente que comprende una solución neutralizante que comprende una base y/o regulador(es) de pH para llevar la solución ácida del primer recipiente a la fuerza iónica fisiológica y al pH para formar un material digerido neutralizado. En otra forma de realización, el primer recipiente contiene un digerido de pre-neutralización esterilizado de modo terminal, liofilizado, que puede hidratarse usando agua o una solución acuosa adecuada que opcionalmente neutraliza el ácido. En otra forma de realización, se proporciona opcionalmente un segundo recipiente que comprende una solución de neutralización como se describió anteriormente que es capaz de hidratar el producto liofilizado y neutralizarlo, u opcionalmente un tercer recipiente que comprende agua o cualquier otra solución adecuada útil para hidratar el producto liofilizado antes de neutralización con la solución de neutralización. Este kit también incluye opcionalmente una aguja de mezcla y/o una compresa fría. El recipiente puede ser un vial, una jeringa, un tubo o cualquier otro recipiente adecuado para el almacenamiento y la transferencia en las rutas de distribución comercial del kit.

La composición de gel se puede moldear y pregelificar antes de su envasado y distribución. El gel moldeado se envasa en un blíster que comprende un recipiente de plástico y una porción de sellado de papel, plástico y/o aluminio, como es bien conocido en la técnica. El molde y el envase típicamente se esterilizan antes o después del empaquetado, por ejemplo y sin limitación, por medio de irradiación con rayos gamma o de electrones o CO<sub>2</sub> supercrítico. La composición moldeada se puede envasar en cualquier solución fisiológica adecuada, como PBS o solución salina. Si el gel moldeado contiene células vivas, el molde puede transportarse en un medio de cultivo celular adecuado en un frasco sellado u otro recipiente. Por supuesto, el gel moldeado que contiene células debería enviarse de manera expedita para preservar las células.

Como se usa en el presente documento, el término "armazón híbrido inorgánico/ECM" se refiere a un gel que proviene de ECM que está revestido sobre una estructura inorgánica biocompatible tal como, sin limitación, un metal, un compuesto de calcio inorgánico tal como hidróxido de calcio, fosfato de calcio o carbonato de calcio, o una composición cerámica. En una forma de realización, se usa ultrasonido para ayudar en el revestimiento de la estructura inorgánica

con el gel que proviene de ECM. Como se usa en este documento, el término "ultrasonido" se refiere al procedimiento de exponer ondas ultrasónicas con una frecuencia superior a 15 kHz e inferior a 400 kHz.

Como se usa en el presente documento, el término "revestir" y cognados relacionados tales como "revestido" y "revestimiento" se refiere a un procedimiento que comprende cubrir una estructura inorgánica con gel que proviene de ECM o armazón inorgánico/ECM híbrido. Por ejemplo y sin limitación, el revestimiento de una estructura inorgánica con gel que proviene de ECM puede incluir procedimientos tales como vertido, incrustación, estratificación, mojado, aspersión.

En otra forma de realización de la tecnología descrita en el presente documento, la composición se reviste sobre un material estructural biocompatible, tal como un metal, un compuesto de calcio inorgánico tal como hidróxido de calcio, fosfato de calcio o carbonato de calcio, o una composición cerámica. Ejemplos no limitativos de metales adecuados son las aleaciones de cobalto-cromo, aleaciones de acero inoxidable, aleaciones de titanio, aleaciones de tantalio, aleaciones de titanio-tantalio, que pueden incluir componentes no metálicos y metálicos, tales como molibdeno, tantalio, niobio, circonio, hierro, manganeso, cromo, cobalto, níquel aluminio y lantano, que incluyen entre otros, CP Ti (titanio comercialmente puro) de diversos grados o Ti 6Al (90% en peso de Ti, 6% en peso de Al y 4% en peso de V), acero inoxidable 316, Nitinol (aleación de níquel-titanio), aleaciones de titanio revestidas con hidroxiapatita. Los metales son útiles debido a su alta resistencia, flexibilidad y biocompatibilidad. Los metales también se pueden moldear en formas complejas y muchos pueden resistir la corrosión en los entornos biológicos, reducir el desgaste y no dañar los tejidos. En un ejemplo no limitante, el metal es un componente femoral o acetabular utilizado para reparación de cadera. En otro ejemplo, el metal es una fibra u otra protuberancia utilizada en la fijación permanente de una prótesis a un paciente. Se pueden preferir otras composiciones, que incluyen cerámica, compuestos de calcio, tales como, sin limitación, aragonito, por ejemplo y sin limitación, en la reparación o remodelación de estructuras esqueléticas o dentales. Las combinaciones de metal, cerámica y/u otros materiales también pueden resultar útiles. Por ejemplo, un componente femoral metálico de un reemplazo de cadera puede comprender una bola de cerámica y/o puede comprender un revestimiento plástico en la superficie de la bola, como podría ser un componente acetabular.

Los metales, así como otros materiales, según sea apropiado, pueden ser útiles en sus diferentes formas, que incluyen, entre otros, alambres, láminas, cuentas, varillas y polvos, incluido el polvo nanocristalino. La composición y la superficie de los metales u otros materiales también pueden modificarse para garantizar la biocompatibilidad, como la pasivación de la superficie a través de tratamientos con silano, el revestimiento con plásticos o cerámicas biocompatibles, materiales composite de metal/cerámica. Los materiales y procedimientos para su empleo son bien conocidos en el campo de la presente invención.

Una dificultad con el uso de insertos metálicos para reparar la estructura esquelética de un paciente es que los insertos deben estar anclados/fijados a las partes esqueléticas existentes. Los procedimientos tradicionales emplean cemento y/o tornillos. En el caso de las prótesis, las prótesis no están conectadas al tejido de un paciente excepto, típicamente, por cementación. Por lo tanto, es deseable fijar biológicamente el tejido de un paciente a un dispositivo médico. Esto se puede lograr revistiendo las superficies del implante con el gel de la ECM descrito en este documento, lo que facilitará el crecimiento del tejido y, por lo tanto, la fijación del dispositivo. Se puede fijar una variedad de estructuras porosas al implante para crear un armazón en el que se pueda infiltrar el gel de ECM y, posteriormente, células u otro tejido (por ejemplo, hueso). Las estructuras incluyen, sin limitación: malla tejida o no tejida, materiales porosos similares a esponjas, cuentas fundidas, etc. El armazón poroso facilitará la formación de un fuerte vínculo entre el tejido vivo, incluido el hueso, y el dispositivo. Los "poros" del armazón poroso pueden ser de cualquier tamaño que permita la infiltración de un gel de la ECM, opcionalmente facilitado por ultrasonido u otros tratamientos que ayuden a la permeación del gel, y más tarde células u otros materiales biológicos, como hueso, cartilago, tendones, ligamentos, fascia u otro tejido conectivo, dentro del armazón. En una forma de realización, las fibras metálicas se fijan al dispositivo, y las fibras metálicas se revisten con un gel de la ECM descrito en el presente documento, lo que permite el crecimiento de tejido dentro de las fibras. En una segunda realización, una matriz de pequeñas cuentas está soldada o fijada de otro modo a una superficie del dispositivo y un gel de ECM descrito en el presente documento está revestido sobre la matriz de cuentas, lo que facilita el crecimiento de tejido entre las cuentas. En un ejemplo, un dispositivo contiene una protuberancia de fibras que se puede insertar dentro de un hueso, lo que permite la fusión de las fibras metálicas con el hueso. En una forma de realización, el gel de la ECM se siembra y se incuba con una población celular adecuada, tal como osteoblastos autólogos, para facilitar el crecimiento óseo.

En otra forma de realización, el armazón híbrido inorgánico/ECM también se puede usar para revestir otros implantes estructurales, tales como, sin limitación, un implante femoral, una prótesis de la mano. La figura 1 muestra esquemáticamente una forma de realización de un dispositivo 10 insertado en un fémur 15 en un procedimiento de reemplazo de cadera. La figura 1 ilustra el dispositivo 10, que muestra una porción de inserto 20 para su inserción en el fémur 15, y una extensión 25 en la que se atornilla o se inserta de otra manera una bola (no mostrada). El dispositivo 10 comprende un revestimiento poroso 30 de, por ejemplo y sin limitación, cuentas metálicas soldadas sobre el dispositivo 10. La región A en la figura 1 muestra una vista ampliada del revestimiento 30 del dispositivo 10. Las cuentas 32 están soldadas a la superficie metálica 34 del dispositivo 10. El gel de la ECM 36 está revestido sobre y entre las cuentas 32. El crecimiento del tejido óseo en cuentas 32 se facilita por la presencia del gel de la ECM 36.

Una prótesis se puede anclar en el hueso de manera similar mediante el uso de un inserto que tiene un revestimiento poroso, y el revestimiento poroso se extiende hasta los límites de donde se desea la fijación al tejido de un paciente.

Como ejemplo mostrado en la figura 2, una prótesis de mano 100 comprende una porción externa 115 y una porción interna 120, que comprende una porción de inserto de radio 122 y una porción de inserto cubital 124. El revestimiento poroso 130 se extiende desde las porciones de inserto 122 y 124 para la fijación al hueso, hasta el comienzo de la porción externa 115, lo que permite la fijación de la dermis y el tejido intermedio entre los huesos y la dermis.

5 Un dispositivo (por ejemplo, una prótesis) como se describe en el presente documento puede revestirse con pre-gel neutralizado y luego la temperatura del gel se eleva para hacer que el pre-gel neutralizado se gelifique. En otra forma de realización, el pre-gel ácido se aplica al dispositivo o prótesis. El pre-gel sobre el dispositivo se puede secar, por ejemplo, liofilizarse y todo el dispositivo puede esterilizarse de modo terminal, seguido de envasado y distribución. El producto liofilizado sobre el dispositivo puede hidratarse por un usuario final y neutralizarse mediante la aplicación de agua, solución salina o PBS al dispositivo y, posteriormente o simultáneamente, elevando la temperatura del dispositivo, por ejemplo, por encima de 37°C.

10 En uso, el dispositivo que está revestido con un armazón adecuado y gel de ECM como se describe en el presente documento puede ponerse en contacto con células, por ejemplo, de un paciente o células alogénicas, y se permite que las células se infiltren en la matriz. El crecimiento o la infiltración de células puede ocurrir *in vivo* o *ex vivo*, dependiendo de la optimización de los procedimientos. Por ejemplo y sin limitación, en el caso de un implante femoral, el implante puede insertarse en el fémur y las células de un paciente, y el tejido óseo deseable, se infiltra en el armazón para fusionar el dispositivo con el hueso. En otra forma de realización, por ejemplo, en el caso de un tendón o ligamento artificial, se incubaba una biopsia de los tendones o ligamentos de un paciente con un armazón apropiado para crear un injerto de ligamento o tendón autólogo.

## 20 Ejemplos

### **Ejemplo 1- Preparación de matriz extracelular porcina (ECM) (UBM)**

La preparación de UBM ha sido descrita previamente [Sarıkaya A, et al. Tissue Eng. Febrero de 2002; 8 (I): 63-71; Ringel RL, et al. J Speech Lang Hear Res. Febrero de 2006; 49 (I): 194-208]. En resumen, se recolectaron vejigas urinarias porcinas de cerdos de 108-118 kg (Whiteshire-Hamroc, IN) de 6 meses de edad inmediatamente después de la eutanasia. El tejido conectivo y el tejido adiposo se eliminaron de la superficie serosa y la orina residual se eliminó mediante lavados repetidos con agua corriente. La túnica serosa, la túnica muscularis externa, la túnica submucosa y la mayoría de la túnica muscularis mucosa fueron retiradas mecánicamente. Las células uroteliales de la mucosa de la túnica se disociaron de la superficie luminal mojando el tejido en solución salina de 1,0 N, por lo cual se produjo un biomaterial compuesto por la membrana basal más la túnica propia subyacente, que se conoce como matriz de vejiga urinaria (UBM). Véase la figura 3 para una vista en sección transversal de la pared de la vejiga urinaria, así como de las estructuras incluidas dentro.

Las láminas de UBM se desinfectaron durante dos horas en un agitador en una solución que contenía 0,1% (v/v) de ácido peracético, 4% (v/v) de etanol y 95,9% (v/v) de agua estéril. El residuo de ácido peracético se eliminó lavando con solución salina estéril con pH regulado con fosfato (pH = 7,4) dos veces durante 15 minutos cada una y dos veces durante 15 minutos cada una con agua estéril. Las láminas de UBM (como en la figura 4A) se liofilizaron luego (figura 4B) usando un secador por congelación a granel modelo 8-54 de FTS Systems y se pulverizaron usando un minimolino Wiley.

Un gramo de polvo liofilizado de UBM (Figura 4B) y 100 mg de pepsina se mezclaron ambos en 100 ml de HCl 0,01 M. La solución se mantuvo en agitación constante durante ~48 h a temperatura ambiente (25 °C). Después de la digestión con pepsina, la solución de material digerido (figura 4C) se dividió en alícuotas y se almacenó a -20°C hasta su uso. Una vez completada, la solución se denomina solución digerida o digestión ECM o solución madre de ECM.

### **Ejemplo 2- Preparación de ECM de bazo porcino**

Se obtuvo tejido de bazo fresco. Las capas externas de la membrana del bazo se eliminaron cortando en rodajas, donde el tejido restante se cortó en trozos uniformes. Los restos de la membrana externa se recortaron, luego se enjuagaron tres veces en agua. El agua fue filtrada usando un tamiz. Los esplenocitos se lisaron mediante masaje. Las rodajas de bazo se incubaron en una solución de tripsina de 0,02 % / EDTA de 0,05% a 37°C durante 1 hora en un baño de agua. Si es necesario, los esplenocitos se lisaron aún más por medio de masaje. Después de enjuagar, las rodajas se remojaron en solución Triton X-100 al 3% y se pusieron en un agitador durante 1 hora. Si es necesario, los esplenocitos se lisaron aún más por medio de masaje. Luego se remojaron las rodajas en una solución de ácido desoxicólico al 4% y se pusieron en un agitador durante 1 hora. Después de enjuagar minuciosamente, la ECM del bazo purificada se almacenó para su posterior tratamiento. Este tejido se desinfectó a continuación por medio de tratamiento con ácido peracético y se secó.

Un gramo de ECM de bazo porcino seco y 100 mg de pepsina se mezclaron en 100 ml de HCl 0,01 M. La solución se mantuvo en agitación constante durante ~72 h a temperatura ambiente (25 °C). Si no hay pedazos visibles de la ECM flotando en la solución, la muestra se divide en alícuotas y se congela (-20°C) o se usa inmediatamente.

### **Ejemplo 3- Preparación de ECM de estroma hepático porcino**

Se obtuvo tejido hepático fresco. Se recortó el exceso de grasa y tejido. Las capas externas de la membrana del hígado se eliminaron recortando en rodajas, donde el tejido restante se cortó en trozos uniformes. Los restos de la membrana externa se recortaron mediante el uso de un bisturí o una cuchilla de afeitar, luego se enjuagaron tres veces en agua. El agua fue filtrada usando un tamiz. Las células se lisaron mediante masaje. Las rodajas de hígado se incubaron en una solución de tripsina al 0,02%/EDTA al 0,05% a 37°C durante 1 hora en un baño de agua. De ser necesario, las células se lisaron aún más por medio de masaje. Después de enjuagar, las rodajas se remojaron en solución Triton X-100 al 3% y se pusieron en un agitador durante 1 hora. De ser necesario, las células se lisaron aún más por medio de masaje. Luego se remojaron las rodajas en una solución de ácido desoxicólico al 4% y se pusieron en un agitador durante 1 hora. Después de enjuagar minuciosamente, el estroma hepático purificado se almacenó en agua desionizada para su posterior tratamiento. Este tejido se desinfectó a continuación por medio de tratamiento con ácido peracético y se secó.

Un gramo de ECM seca de estroma de hígado porcino y 100 mg de pepsina se mezclaron en 100 ml de HCl 0,01 M. La solución se mantuvo en agitación constante durante ~24-48 h. a temperatura ambiente (25°C). Si no hay pedazos visibles de la ECM flotando en la solución, la muestra se divide en alícuotas y se congela (-20°C) o se usa inmediatamente.

**Ejemplo 4- Preparación de ECM de estroma hepático humano**

Se obtuvo tejido hepático fresco. Se recortó el exceso de grasa y tejido. Las capas externas de la membrana del hígado se eliminaron recortando en rodajas, donde el tejido restante se cortó en trozos uniformes. Los restos de la membrana externa se recortaron mediante el uso de un bisturí o una cuchilla de afeitar, luego se enjuagaron tres veces en agua. El agua fue filtrada usando un tamiz. Las células se lisaron mediante masaje. Las rodajas de hígado se incubaron en una solución de tripsina al 0,02%/EDTA al 0,05% a 37°C durante 1 hora en un baño de agua. De ser necesario, las células se lisaron aún más por medio de masaje. Después de enjuagar, las rodajas se remojaron en solución Triton X-100 al 3% y se pusieron en un agitador durante 1 hora. De ser necesario, las células se lisaron aún más por medio de masaje. Luego se remojaron las rodajas en una solución de ácido desoxicólico al 4% y se pusieron en un agitador durante 1 hora. Después de enjuagar minuciosamente, el estroma hepático purificado se almacenó en agua desionizada para su posterior tratamiento. Este tejido se desinfectó a continuación por medio de tratamiento con ácido peracético y se secó.

Se mezclaron un gramo de ECM de estroma de hígado humano seco y 200 mg de pepsina en 50 ml de HCl 0,01 M. La solución se mantuvo a agitación constante durante ~3-5 días a temperatura ambiente (25°C). La solución deberá ser monitoreada todos los días. Si no hay pedazos visibles de la ECM flotando en la solución, la muestra se divide en alícuotas y se congela (-20°C) o se usa inmediatamente.

**Ejemplo 5- Preparación de ECM cardíaca porcina**

Un gramo de ECM cardíaca porcina seca con 100 mg de pepsina se mezclaron ambos en 50 mL de HCl 0,01 M. La solución se mantuvo a agitación constante durante ~48 horas a temperatura ambiente (25°C).

**Ejemplo 6- Preparación de ECM pancreática porcina**

Un gramo de ECM pancreática porcina desgrasada seca con 100 mg de pepsina se mezclaron ambos en 50 mL de HCl 0,01 M. La solución se mantuvo a agitación constante durante ~48 horas a temperatura ambiente (25°C).

**Ejemplo 7: Preparación de ECM ovárica porcina**

Se obtiene tejido ovárico fresco dentro de las 6 horas posteriores a la cosecha. Se retiraron los ovarios y se almacenaron en tejido de solución salina fisiológica hasta estar listos para la disección y se eliminó el tejido uterino residual. Se hicieron incisiones longitudinales a través del hilio del ovario y se alteraron los folículos. Una vez que se han alterado todos los folículos, se extrae la ECM de los ovarios. Se enjuaga tres veces en agua filtrada y se filtra el agua con un tamiz. Las células se lisaron mediante un suave masaje. La ECM se incubó en una solución de 0,02% de tripsina/0,05% de EDTA a 37°C durante 1 hora en un baño de agua y luego se enjuagó. De ser necesario, las células se lisaron aún más por medio de masaje. La ECM se mojó en una solución de Triton X-100 al 3% y se puso en un agitador durante 1 hora. Después del enjuague, las células se lisaron aún más mediante masaje, de ser necesario. Luego se remojaron las rodajas en una solución de ácido desoxicólico al 4% y se pusieron en un agitador durante 1 hora. Después de enjuagar minuciosamente para eliminar el tensioactivo residual, la ECM se almacenó en agua estéril/filtrada hasta su uso posterior. Este tejido se desinfectó a continuación por medio de tratamiento con ácido peracético y se secó.

Un gramo de polvo liofilizado de ECM ovárica y 100 mg de pepsina se mezclaron en 100 ml de HCl 0,01 M. La solución se mantuvo en agitación constante durante ~48 h a temperatura ambiente (25 °C). Después de la digestión con pepsina, la solución de material digerido se dividió en alícuotas y se almacenó a -20°C hasta su uso.

**Ejemplo 8: Preparación de la ECM de médula espinal y duramadre.**

Mediante el uso de fórceps, tijeras y un bisturí, se extrajo la duramadre de la médula espinal porcina. La superficie interna de la duramadre se raspó con una cuchilla de bisturí para eliminar cualquier residuo. La médula espinal y la duramadre se colocaron en contenedores separados y se trataron de la misma manera que a continuación. La médula espinal se cortó longitudinalmente o en sección transversal para aumentar el área de superficie y se colocó en un casete. Opcionalmente, el tejido se trató enzimáticamente mediante el uso de tripsina-EDTA durante 30 minutos a 37°C. El tejido se incubó en soluciones de Triton X-100™ (4-octilfenol polietoxilato) al 3% durante períodos de hasta 2-3 días a 4°C. Esta etapa se repitió con una solución de Triton X-100™ al 6% y nuevamente con una solución de Triton X-100™ al 9%. El tejido de la médula espinal se incubó en lecitina o lecitina-desoxicolato para eliminar los lípidos durante la noche a 4°C. La duramadre no fue sometida a este procedimiento. Luego se lavó el tejido en Triton X-100™ al 3% o SDS al 1% durante 1-2 horas. El tejido se enjuagó en PBS 3X durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego, el tejido se incubó en una solución de DNasa I durante 1 hora a temperatura ambiente. El tejido se lavó en PBS tres veces durante 15 minutos a temperatura ambiente. Por último, el tejido se lavó en agua desionizada tres veces durante 15 minutos a temperatura ambiente. El procedimiento produjo un material de médula espinal acelular similar a un gel y una lámina de material de duramadre acelular.

#### 15 **Ejemplo 9 - Preparación de ECM adiposa**

El tejido adiposo congelado se descongeló en agua y se masajó manualmente para acelerar la lisis de las células. El tejido se colocó en un matraz que contenía una solución de tripsina al 0,02 %/EDTA al 0,05 % y se incubó a 37 °C durante una hora, luego se enjuagó brevemente con agua destilada desionizada (ddH<sub>2</sub>O) y se masajó manualmente nuevamente. Luego se colocó el tejido en un matraz que contenía Triton X-100 al 3% y se colocó en un agitador orbital durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de un breve enjuague con agua, el tejido se colocó en una solución de ácido desoxicólico al 4% y nuevamente se colocó en un agitador orbital durante 1 hora a temperatura ambiente. El tejido se enjuagó tres veces en agua y se almacenó a 4°C durante la noche. Luego se sometió el tejido a una solución de etanol al 4% y ácido peracético al 0,1% en un agitador orbital durante 2 horas seguido de dos soluciones salinas de pH regulado con fosfato (PBS, pH 7,4) y dos lavados con agua de 15 minutos cada uno a temperatura ambiente. El material resultante se lavó luego en n-propanol al 100% durante una hora en un agitador orbital a temperatura ambiente y se lavó en cuatro cambios de ddH<sub>2</sub>O durante una hora para eliminar el n-propanol antes de la liofilización.

#### 25 **Ejemplo 10 - Preparación de gel de ECM derivada de sistema nervioso**

El tejido de la médula espinal murina se almacenó a -80°C hasta que se necesitó para el tratamiento de derivación de ECM. El material se descongeló y la duramadre se retiró de la médula espinal, y la médula espinal se cortó luego en cuartos longitudinalmente de alrededor de 1 pulgada (2,54 cm) de longitud y espesor uniforme. Los pedazos de la médula espinal se colocaron en agua durante la noche a 4°C y 120 rpm para alterar mecánicamente la arquitectura del tejido nativo antes de la descelularización. Después de aproximadamente 18 h, los pedazos de la médula espinal se retiraron del agua colando sobre una malla o tamiz con un tamaño de orificio de aproximadamente 840 μm. Los trozos de médula espinal se recogieron con fórceps y se colocaron en un matraz para la digestión con proteasa con solución de 0,02% de tripsina/0,05% de EDTA. La digestión se dejó proceder en un baño de agua durante 1 hora a 37°C mientras se agitaba a 120 rpm. Después de una hora, la solución se filtró y el tejido de la médula espinal se enjuagó suavemente con un chorro de agua, desenredando según se requiriera. Los pedazos de la médula espinal se devolvieron al matraz, recogiendo tantos pedazos de tejido más pequeños como fuera posible del colador con unas pinzas. Luego se añadió la solución Triton X-100 de 3% al matraz para comenzar la descelularización del tejido, que se colocó en un agitador durante 1 hora a 200 rpm. Después de una hora, se filtró el tejido, se enjuagó y se recogió. Los pedazos de tejido se volvieron a colocar en el matraz y luego se sometieron a un choque osmótico para una descelularización adicional. Se añadió sacarosa hipertónica de 1 M al matraz y se colocó en un agitador durante 15 minutos a 200 rpm. El tejido se filtró, se enjuagó, se recogió y se combinó con solución hipotónica (agua desionizada) y se colocó en un agitador durante 15 minutos a 200 rpm, para lisar las células restantes. El tejido descelularizado se volvió a filtrar, enjuagar y recuperar en un matraz. Se añadió una solución de desoxicolato al 4% al matraz y se colocó en un agitador durante 1 hora a 200 rpm. Posteriormente, los pedazos de tejido se filtraron y se enjuagaron repetidamente en agua tipo I (ultrapura) hasta que se eliminaron todos los rastros de tensioactivos (burbujas). El tejido restante, ahora enriquecido en ECM, se recogió y desinfectó usando una solución de ácido peracético (compuesta de agua Tipo I (96%) y alcohol EtOH al 100% (4%)) en una relación de solución de ácido peracético a peso de ECM de 20:1 y se agitó a 200 rpm durante dos horas. Después de una serie de etapas de enjuague en solución salina con pH regulado con fosfato (PBS), la ECM se congeló a -20°C y luego se liofilizó hasta que se eliminó toda el agua. El material de pre-gel de armazón de gel se fabricó agregando ECM liofilizada a una solución de ácido clorhídrico de 0,01 N que contenía 1,0 mg/ml de pepsina, que se diluyó con solución salina isotónica para producir concentraciones de ECM entre aproximadamente 1 mg/ml y 200 mg/ml, dependiendo de la viscosidad deseada del armazón.

#### 55 **Ejemplo 11- Procedimiento general de preparación de geles a partir de ECM**

El gel UBM se formó en un gel mezclando NaOH de 0,1 N (1/10 del volumen de solución de material digerido) y 10X PBS pH 7,4 (1/9 del volumen de solución de material digerido) en cantidades apropiadas a 4°C. La solución se llevó al volumen y concentración deseados mediante el uso de 1X PBS frío (4°C) pH 7,4 y se colocó en una incubadora a 37°C para que ocurriera la gelificación (figura 4D).

La ECM pudo formar una matriz después de 40 minutos en solución como se muestra en Figura 4. El gel que proviene de ECM era líquido a temperaturas inferiores a 20°C, pero se convirtió en un gel cuando la temperatura se elevó a 37°C.

5 Al preparar geles a partir de ECM, todas las siguientes soluciones deben mantenerse en hielo y deben determinarse las siguientes variables:

- $C_f$  = concentración del gel final en mg/ml
- $C_s$  = concentración de la solución de material digerido de ECM en mg/ml
- $V_f$  = volumen de la solución de gel final necesaria para los experimentos.
- $V_d$  = volumen necesario de la solución de material digerido de ECM en ml
- 10  $V_{10X}$  = volumen de 10X PBS necesario en ml
- $V_{1X}$  = volumen de 1X PBS necesario en ml
- $V_{NaOH}$  = volumen de 0,1 N NaOH necesario en ml

15 Primero, se determina la concentración final ( $C_f$ ) y el volumen ( $V_f$ ) de gel de la ECM requeridos. Luego, se calcula la masa de ECM necesaria multiplicando  $C_f$  (mg/ml) \*  $V_f$  (ml). Este valor dará el volumen necesario de la solución de material digerido de ECM ( $V_d$ ), en el que ( $V_d$ ) = [ $C_f$ (mg/ml) \*  $V_f$ (ml)] /  $C_s$ .

20 Se calcula el volumen de 10X PBS necesario dividiendo el volumen calculado  $V_d$  por 9 ( $V_{10X} = V_d/9$ ). Se calcula el volumen de NaOH de 0,1 N necesario dividiendo el volumen calculado  $V_d$  por 10 ( $V_{NaOH} = V_d/10$ ). Se calcula la cantidad de 1X PBS necesaria para llevar la solución a la concentración/volumen apropiados tal como sigue:  $V_{1X} = V_f - V_d - V_{10X} - V_{NaOH}$ . Se agregan todos los reactivos ( $V_{1X} + V_d + V_{10X} + V_{NaOH}$ ) a un recipiente apropiado (generalmente tubos de centrífuga de 15 o 50 ml) sin la el material digerido de ECM ( $V_d$ ). Se colocan las soluciones en hielo y se mantienen en el mismo a todo momento.

25 Se agrega el volumen apropiado de la solución de material digerido de ECM ( $V_d$ ) a la mezcla de PBS/NaOH preparada anteriormente y se mezcla bien con una micropipeta de 1 ml mientras se tiene cuidado y se evita la creación de burbujas de aire en la solución. Dependiendo de la viscosidad de la solución de material digerido de ECM, puede haber una pérdida de volumen significativa durante la transferencia. Se monitorea el volumen total y se agregan cantidades apropiadas hasta alcanzar el volumen final. Se mide el pH de la solución de pre-gel, donde el pH debe estar alrededor de 7,4.

30 Se agrega la solución de pre-gel a un molde o a pocillos apropiados. Se coloca el molde o los pocillos en una incubadora a 37°C durante un mínimo de 40 minutos. Se evita usar una incubadora con control de CO<sub>2</sub>. Si la evaporación del agua es un motivo de preocupación, se coloca el molde dentro de una bolsa plástica con cierre hermético antes de colocarlo en la incubadora. Después de la gelificación, el gel puede retirarse del molde y colocarse en 1X PBS. Si los geles se hicieron en placas de cultivo de tejidos, 1X PBS se puede colocar encima de los geles hasta su uso para mantener los geles hidratados.

35 Cálculo de la muestra: Cálculo de muestra: preparar 6 ml de gel con una concentración final de 6 mg/ml a partir de la solución madre de 10 mg/ml.

$$\text{GIVEN: } C_s = 10 \text{ mg/ml}; C_f = 6 \text{ mg/ml}; V_f = 6 \text{ ml}$$

$$V_d = [6 \text{ mg/ml} * 6 \text{ ml}] / 10 \text{ mg/ml} = 3.600 \text{ ml}$$

$$V_{10X} = 3.6 / 9 = 0.400 \text{ ml}$$

$$V_{NaOH} = 3.6 / 10 = 0.360 \text{ ml}$$

$$40 \quad V_{1X} = 6 \text{ ml} - 3.6 \text{ ml} - 0.400 \text{ ml} - 0.360 = 1.640 \text{ ml}$$

**Ejemplo 12- Composición y morfología de UBM porcina.**

Las soluciones de UBM y colágeno de cola de rata tipo I (BD, Biosciences) se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 4-20% en condiciones reductoras (5% 2-mercaptoetanol). Las proteínas fueron visualizadas con Gel-Code Blue (Bio-Rad), y documentadas por una estación de escaneo Kodak.

45 El contenido de colágeno y glucosaminoglicano sulfatado (S-GAG) se determinó mediante el uso del ensayo de hidroxiprolina [Reddy GK, et al. "A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues" ["Un procedimiento simplificado para el análisis de hidroxiprolina en tejidos biológicos"] (1996) Clin. Biochem. 29 (3):225-9] y el kit de ensayo Blyscan™ (Bicolor, Irlanda del Norte) respectivamente (se analizaron tres muestras). El ensayo Blyscan™ se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El contenido de hidroxiprolina se determinó hidrolizando las muestras con NaOH de 2 M (100 µm de volumen total) en una autoclave a 120°C durante 20 minutos.

50 Las muestras se neutralizaron con 50 µm de HCl de 4 M y se hicieron reaccionar con 300 µm de cloramina-T (Spectrum) de 0,056 M, se mezclaron suavemente y se dejaron oxidar durante 25 minutos a temperatura ambiente.

Las muestras se mezclaron con 300  $\mu\text{m}$  de aldehído de Ehrlich de 1 M (Spectrum) y se incubaron a 65°C durante 20 minutos. Se generó una curva estándar usando colágeno de cola de rata tipo I (BD Biosciences) y se usó para calcular la cantidad total de colágeno presente en las soluciones de UBM digerida. El cambio colorimétrico se determinó por la absorbancia a 550 nm usando un espectrofotómetro SpectraMax.

5 La composición del gel ha sido determinada. Se encontró que la concentración de colágeno para UBM digerida con pepsina era de  $0,8 \pm 0,2$  mg por mg de polvo de UBM liofilizado seco (media  $\pm$  DE). Se encontró que el contenido total de S-GAG era de  $5,1 \pm 0,9$   $\mu\text{g}$  por mg de polvo UBM liofilizado seco (media  $\pm$  DE). Las proteínas sometidas a electroforesis muestran las bandas típicas para el colágeno tipo I presente en el carril de UBM con bandas adicionales como se muestra en la figura 5. La diferencia puede deberse en parte a los componentes adicionales (es decir, a  
10 pequeños péptidos y glucosaminoglicanos) presentes en los geles de UBM.

La morfología de la superficie de los geles de UBM se examinó mediante el uso de un microscopio electrónico de barrido (SEM). Los especímenes se fijaron en glutaraldehído al 2,5% frío y se enjuagaron en PBS, seguido de un procedimiento de deshidratación a través de una serie graduada de etanol (30% a 100%), y finalmente se secaron críticamente en un secador de punto crítico Emscope CPD 750. Las muestras se fijaron a trozos de montaje de  
15 espécimen de aluminio SEM (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) y se revistieron por pulverización con una aleación de oro y paladio usando un Sputter Coater 108 Auto (Cressington Scientific Instruments, Valencia, PA). Finalmente, las muestras se examinaron usando un microscopio electrónico de barrido (JEOL 6330F). Las imágenes se tomaron con un aumento de 5.000 y 10.000 X. Las imágenes de microscopía electrónica de barrido muestran la apariencia fibrilar de los geles de UBM a concentraciones de 3 mg/ml y 6 mg/ml (figura 6A-6D), así como a 4 mg/ml  
20 (figura 7B).

#### **Ejemplo 10- Propiedades reológicas y cinética de gelificación de geles de UBM, SIS y LS porcinas.**

Las propiedades reológicas del gel que proviene de UBM se caracterizaron durante la gelificación. El gel de UBM consiste en una solución viscosa a una temperatura inferior a 25°C y un gel a temperaturas fisiológicas (37°C). Las propiedades reológicas de otros geles se pueden medir utilizando procedimientos similares descritos en este  
25 documento. También se midieron las propiedades reológicas del estroma hepático (LS) y la submucosa del intestino delgado (SIS).

La cinética de gelificación turbidimétrica se determinó espectrofotométricamente como se describió previamente (Gelman RA, et al, "Collagen fibril formation. Evidence for a multistep process" ["Formación de fibrillas de colágeno. Evidence for a multistep process", (1979) J. Biol. Chem. 254(1):180-6). Las soluciones finales de pre-gel a la  
30 concentración apropiada se mantuvieron a 4°C y se transfirieron a una placa fría de 96 pocillos colocando 100  $\mu\text{m}$  por pocillo por triplicado. El espectrofotómetro SpectraMax (Molecular Devices) se precalienta a 37°C, la placa se coloca en el espectrofotómetro y la turbidez de cada pocillo se mide a 405 nm cada 2 minutos durante 1,5 horas (figura 8 A). La turbidez también se puede medir a 530 nm (figura 9). Los valores de absorbancia se registraron y normalizaron como se muestra en la figura 8B. El tiempo necesario para alcanzar el 50% de la medición de turbidez máxima (por  
35 ejemplo, el valor de absorbancia máxima) se definió como  $t_{1/2}$  y la fase de retraso (tlag) se calculó extrapolando el crecimiento lineal de la curva. La velocidad (S) de la gelificación basada en mediciones turbidimétricas se determinó calculando la pendiente de la porción de crecimiento de la curva como se muestra en la figura 8B.

Las mediciones oscilatorias dinámicas se usan comúnmente en estudios fundamentales de gelificación y en la caracterización de las propiedades viscoelásticas de los geles. La muestra fue sometida a una deformación oscilatoria  
40 de

$$\gamma(t) = \gamma_0 \cos(2\pi ft) \quad (1)$$

en la que  $\gamma_0$  era la amplitud de la deformación sinusoidal,  $t$  era el tiempo y  $f$  era la frecuencia. La muestra desarrolló un esfuerzo sinusoidal descrito a continuación:

$$\sigma(t) = |G^*| \gamma(t) \quad (2)$$

45 donde  $G^*$  era el módulo complejo, dependiente de la frecuencia, de la muestra. La parte real de  $G^*$ , denominada  $G'$ , estaba en fase con la deformación aplicada y se llamaba módulo de almacenamiento, ya que correspondía al almacenamiento de energía mecánica en la deformación elástica de la muestra. La porción imaginaria de  $G^*$ , denotada  $G''$ , estaba desfasada 90° con la deformación aplicada y se denominó módulo de pérdida, ya que correspondía a la pérdida de energía por disipación viscosa dentro de la muestra. Como se esperaba que la muestra desarrollara  
50 características similares a la de un sólido a medida que avanzaba la gelificación, se esperaba que  $G'$  aumentara significativamente.

Una propiedad final de interés fue la magnitud de la viscosidad compleja definida de la siguiente manera:

$$|\eta^*| = \frac{|G^*|}{2\pi f} = \frac{\sqrt{G'^2 + G''^2}}{2\pi f} \quad (3)$$

donde  $|\eta^*|$  era la viscosidad compleja dependiente de la frecuencia,  $G^*$  era el módulo complejo dependiente de la frecuencia, y  $f$  era la frecuencia. Es común ajustar los datos complejos de viscosidad versus frecuencia a una ley de potencia de la forma:

$$|\eta^*| = k f^{-n} \quad (4)$$

5 donde  $k$  y  $n$  son ambas constantes.

Los experimentos reológicos se realizaron con un reómetro controlado por esfuerzo AR2000 de TA Instruments mediante el uso de una geometría de placa paralela de 40 mm de diámetro y una celda Peltier para mantener la temperatura de la muestra. Las muestras se prepararon como se discutió anteriormente y se cargaron en el reómetro con la celda Peltier manteniendo una temperatura de 15°C. El borde de la muestra se protegió de la evaporación aplicando aceite mineral. La viscosidad de la muestra se midió primero aplicando una tensión constante de 1 Pa sobre la muestra durante un minuto a 15°C. La temperatura se ajustó luego a 37°C para inducir la gelificación; la celda Peltier típicamente alcanzó una temperatura de 30°C en 10 segundos y 37°C en 50 segundos. Durante este aumento de temperatura y la posterior gelificación, los módulos oscilatorios de la muestra se monitorearon continuamente a una frecuencia fija de 0,159 Hz (1 rad/s) y una deformación del 5%. Cuando no hubo más cambios en el módulo elástico ( $G'$ ) con el tiempo, se consideró que la gelificación estaba completa. Las propiedades viscoelásticas lineales finales del gel se midieron realizando un barrido de frecuencia entre 15,9 Hz y 0,08 Hz a 37°C y 5% de deformación y se ajustaron a la ecuación 4.

La cinética de gelificación turbidimétrica y los parámetros calculados se muestran en la Figura 8 y los resultados se presentan en la Tabla 1. La cinética de gelificación turbidimétrica para los geles de UBM y colágeno tipo I siguió una forma sigmoideal (figura 8A). Los geles de colágeno tipo I a una concentración de 3 mg/ml se volvieron más turbios después de la gelificación que el gel de UBM a una concentración de 3 mg/ml y 6 mg/ml (figura 8A). La fase de retraso ( $t_{lag}$ ) y el tiempo requerido para alcanzar la mitad de la turbidez final ( $t_{1/2}$ ) fueron mayores en el gel de UBM (a 3 y 6 mg/ml) que el colágeno tipo I (3 mg/ml). Además, la velocidad de la cinética de gelificación turbidimétrica ( $S$ ) fue menor para UBM en comparación con el colágeno tipo I. No hubo cambios en  $t_{lag}$ ,  $t_{1/2}$  y  $S$  en geles de UBM con un cambio en la concentración, pero hubo un cambio en la turbidez máxima alcanzada.

La cinética turbidimétrica del gel de SIS de 1 mg/ml también siguió una forma sigmoidea (Figura 9). Mientras que las mediciones de UBM se obtuvieron a 405 nm, las mediciones de SIS se obtuvieron a 530 nm. Las mediciones de SIS también mostraron una disminución en la turbidez antes de alcanzar la turbidez máxima.

Tanto el módulo de almacenamiento ( $G'$ ) como el módulo de pérdida ( $G''$ ) de geles de UBM cambiaron con el tiempo con una forma sigmoidea después de que la temperatura de la muestra se elevó de 15°C a 37°C (figura 10).  $G'$  y  $G''$  alcanzaron un estado estable después de aproximadamente 8 minutos, lo que sugiere que se había producido la gelificación. La cinética de  $G'$  y  $G''$  fue más rápida que la cinética turbidimétrica. Las viscosidades de UBM y colágeno tipo I se muestran en la figura 12 en un intervalo de frecuencia de  $\sim -0,08$ –15 Hz y los resultados se resumen en la Tabla 1.

El módulo de almacenamiento ( $G'$ ) de los geles de LS y SIS también cambió con el tiempo con una forma sigmoidea después de que la temperatura de la muestra se elevó a 37°C (figura 11 A). La cinética de  $G'$  para los geles de LS y SIS fue más rápida que la cinética de  $G'$  para los geles de UBM. El módulo de almacenamiento ( $G'$ ) de los geles de LS, SIS y UBM también se midió en función de la frecuencia angular (figura 11B).

40 **Tabla 1: Resultados del análisis turbidimétrico de la cinética de gelificación de UBM. Los datos representan la media  $\pm$  DE. Se analizaron tres muestras ( $n = 3$ ).**

Material	k	$t_{1/2}$	$t_{lag}$
Colágeno tipo I 3 mg/ml	0,20 (0,01) *	12,2 (1,1) *	9,7 (0,8) *
UBM 3 mg/ml	0,07 (0,01)	24,4 (2,4)	15,8 (2,0)
UBM 6 mg/ml	0,09 (0,04)	22,4 (4,9)	14,1 (3,7)

\* $p < 0,05$

En un esfuerzo por explorar la viabilidad de usar UBM como material inyectable, se realizaron múltiples ensayos para probarlas en un entorno de inyección. El polvo de ECM suspendido en solución salina y los geles de UBM se probaron uno al lado del otro para ver si podían pasar con éxito las agujas de inyección que se usan con frecuencia en procedimientos médicos como el aumento de las cuerdas vocales. Estas agujas tenían puntas de calibre 25 de 1 cm de largo que estaban fijadas a ejes de aguja de calibre 16 de 25 cm de largo. Los geles de UBM pasan fácil y consistentemente a través de estas agujas. La suspensión de polvo de UBM tenía una concentración límite superior

de 10 mg/ml por encima de la cual la aguja se ocluiría con frecuencia, haciendo difícil determinar la cantidad real de ECM administrada. Este ensayo mostró la viabilidad de usar el gel de UMB como material inyectable (Tabla 2).

**Tabla 2: Comparación de la viscosidad de geles de UBM con materiales inyectables disponibles comercialmente.**

Material	k	n	r <sup>2</sup>	Intervalo de frecuencia [Hz]	REF
Matriz de vejiga urinaria 3 mg/ml	2,35	-1,0617	0,988	0,01-15	--
Matriz de vejiga urinaria 6 mg/ml	5,69	-0,9547	0,999	0,01-15	--
Gelatina (Gelfoam)	149,39	-0,9030	0,997	0,01-15	Chan <i>et al.</i> <sup>a</sup>
Zyplast™	99,851	-0,9145	0,998	0,01-15	Chan <i>et al.</i> <sup>a</sup>
Zyderm™	66,395	-0,9154	0,998	0,01-15	Chan <i>et al.</i> <sup>a</sup>
Zyderm™	12	-0,860	0,977	0,01-100	Klemuk <i>et al.</i> <sup>b</sup>
Cymetra®	19,9	-0,778	0,972	0,01-100	Klemuk <i>et al.</i> <sup>b</sup>
Ácido hialurónico -DTPH	3,19	-0,744	0,974	0,01-100	Klemuk <i>et al.</i> <sup>b</sup>
Grasa subcutánea abdominal humana	23,576	-0,9508	0,994	0,01-15	Chan <i>et al.</i> <sup>a</sup>
Politetrafluoroetileno (PTFE)	1151,9	-1,0267	0,997	0,01-15	Chan <i>et al.</i> <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Chan RW, et al. Viscosities of implantable biomaterials in vocal fold augmentation surgery [Viscosidades de biomateriales implantables en cirugía de aumento de pliegue vocal]. *Laryngoscope*. Mayo de 1998; 108(5):725-31.

<sup>b</sup> Klemuk SA, et al. Viscoelastic properties of three vocal-fold injectable biomaterials at low audio frequencies [Propiedades viscoelásticas de tres biomateriales inyectables de pliegue vocal a bajas frecuencias de audio]. *Laryngoscope*. Septiembre de 2004;114(9):1597-603.

## 5 Ejemplo 14 - armazón híbrido inorgánico/ECM

La restauración de la cinemática articular después de la amputación de la extremidad y el reemplazo con una prótesis es limitada debido a la incapacidad de fijar la musculatura existente a la prótesis a través de la inserción ósea de los tendones (Higuera, C.A., et al, *J Orthop Res*. 1091-9 (23) 2005). Aunque una variedad de aleaciones de titanio y tantalio porosas han tenido éxito en promover el crecimiento óseo, no hay alternativas para promover el crecimiento del tejido fibrocartilaginoso que restaura un sitio de inserción de ligamentos o tendones. Recientemente, los armazones de tantalio porosos han sido investigados por su capacidad para promover el crecimiento interno de un tejido fibroso vascularizado con una fuerza mecánica prometedor (Hacking, S.A., et al: *J Biomed Mater Res*, 631-8 (52) 2000). También se ha demostrado que los armazones de matriz extracelular (ECM) derivados naturalmente del intestino delgado y la vejiga urinaria (UMB) porcinos forman tendones, ligamentos, cartílagos y huesos bien organizados, así como sitios fuertes de inserción ósea con buena resistencia mecánica (Badylak, SF: *Transpl Immunol*. 367-77 (12) 2004; Dejardin, L.M., et al: *AJSM*. 175-84 (29) 2001). Es razonable esperar que un armazón de tantalio o titanio poroso con un ECM incrustado dentro de los poros pueda mejorar el crecimiento de tejido blando en la superficie del metal y promover la formación de tejido fibrocartilaginoso. El objetivo del presente estudio fue determinar la viabilidad de revestir un armazón de titanio poroso con un gel de ECM para la eventual aplicación de reparación de inserción de ligamentos o tendones.

El polvo de UBM se produjo como se describió anteriormente (Freytes, DO et al, *Biomaterials*, 2004. 25(12): 2353-61). Se preparó un material digerido de gel UBM mezclando un gramo de polvo de UBM liofilizado con 100 mg de pepsina en 100 ml de HCl de 0,01 M bajo agitación constante durante ~ 48 horas a temperatura ambiente. La polimerización de gel de UBM se inició llevando el pH y la fuerza iónica al intervalo fisiológico usando PBS a 37°C. La polimerización completa del gel se produjo en 30 minutos. Los armazones metálicos porosos se limpiaron con acetona, metanol y agua, y se pasivaron con ácido nítrico al 20-45%.

Se midieron los ángulos de contacto entre el material digerido de gel de UBM (antes [10 mg/ml] y después de la activación fisiológica [6 mg/ml]) y las láminas de CP Ti o Ti 6Al 4V. Se añadió un ml de material digerido a cada superficie y se tomó una fotografía digital para la posterior determinación del ángulo.

5 Se probaron dos procedimientos para la capacidad de promover la penetración del gel de UBM polimerizado en malla de fibra de titanio CP o cuentas sinterizadas de titanio CP. Toda la superficie de cada armazón de metal poroso se cubrió con gel de UBM activado durante 5 minutos. Para la mitad de los armazones, se permitió que el gel penetrara en condiciones estáticas, mientras que en la otra mitad de las muestras la penetración se realizó mediante ultrasonido. Se añadió colorante para visualizar el gel.

10 A fin de verificar la presencia de gel de UBM dentro de los armazones de titanio porosos y comprender mejor la interacción entre el gel de UBM y el metal, se prepararon especímenes para microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM). Dado que las muestras pudieron visualizarse con ESEM mientras aún estaban en condición hidratada, las interacciones entre el armazón de titanio y el gel de UBM pudieron determinarse sin la alteración de la ECM por deshidratación.

15 Tanto el material digerido de gel de UBM como el gel de UBM activado humedecen la superficie de los pocillos CP Ti y Ti 6Al 4V (Tabla 4). Por lo tanto, el metal poroso no debe excluir la ECM. En base a estos resultados, los experimentos posteriores se centraron en el gel activado. El gel de UBM pudo penetrar a la mitad del grosor de cada armazón de metal poroso en estado estático. Con la adición de ultrasonido, los poros se infiltraron en todo el grosor del armazón (figuras 13 A y 13B). El examen de los armazones híbridos con ESEM mostró una excelente penetración y cobertura del titanio poroso (figuras 14A-14D).

20 Es posible crear un armazón híbrido de ECM/metal poroso mediante el uso de gel de UBM y un armazón poroso de titanio. Los estudios futuros evaluarán si estos armazones pueden apoyar el crecimiento celular *in vitro* y promover el crecimiento del tejido conectivo *in vivo*. El objetivo final de este esfuerzo es desarrollar un armazón que promueva el crecimiento de tejido blando en el metal para que sirva como sitio de inserción de ligamentos y tendones.

**Tabla 4 Ángulo de contacto para material de UBM en aleaciones de titanio (media ± SD)**

Tipo de metal	Material digerido de UBM	UBM gel
CP Ti	46,8 ± 1,3	27,0 ± 4,0
Ti6Al4V	38,2 ± 4,8	41,3 ± 1,6

25 **Ejemplo 15 - Esterilización de materiales de ECM predigeridos.**

Se ha observado que la esterilización terminal de un armazón de ECM inhibe la posterior formación de hidrogel de materiales de ECM solubilizados en proteasa. A continuación, se ilustra el efecto de la esterilización sobre la formación cualitativa de hidrogel, utilizando ECM dérmica que no se ha dializado (es decir, ECM intacta como se describió anteriormente). La dermis porcina se descelularizó esencialmente como se describió anteriormente, y se sometió a diversos procedimientos de esterilización terminal. Las láminas dérmicas de ECM se esterilizaron de modo terminal por exposición a (1) radiación gamma a una dosis de 10 kGy, 25 kGy y 40 kGy, (2) radiación de haz de electrones a una dosis de 10 kGy, 25 kGy y 40 kGy, y (3) gas de óxido de etileno (EtO) a una dosis de 750 mg/h durante 16 h. Las láminas de ECM dérmicas de control no se esterilizaron. La ECM dérmica esterilizada y de control se trituró mecánicamente en un molino Wiley con un tamiz de malla 60, se digirió enzimáticamente durante 48 horas a 4°C en 35 1 mg/ml de pepsina en una solución de HCl de 0,01 N para producir un pre-gel, y se probó para la formación de hidrogel por neutralización a aproximadamente pH 7,4 a temperatura ambiente (20-25°C) y luego elevando la temperatura a 37°C en una incubadora sin CO<sub>2</sub>. La figura 15 muestra que la ECM dérmica esterilizada de modo terminal no pudo formar un hidrogel independientemente del procedimiento de esterilización, mientras que la ECM dérmica no esterilizada formó un gel sólido y mantuvo la forma después de la eliminación de los moldes de anillo 40 metálico.

**Ejemplo 16 - Esterilización de producto liofilizado.**

Debido a la ineficaz formación de hidrogel después de la esterilización terminal del material de ECM descelularizado predigerido, y al reconocer la necesidad clínica/comercial de esterilización, se ha planteado la hipótesis de que cambiar la forma del material antes de la esterilización permitiría la gelificación de ECM. En lugar de las láminas de ECM sólidas liofilizadas, se ha esterilizado un pre-gel liofilizado preparado a partir de ECM no dializada (ECM intacta como se describe anteriormente), mecánicamente triturada que se digiere enzimáticamente, esencialmente como se describe anteriormente) y se probó si se produciría la formación de hidrogel. La ECM derivada de la submucosa del intestino delgado (SIS-ECM) se descelularizó de acuerdo con un protocolo estándar sin diálisis. El polvo de SIS-ECM se digirió enzimáticamente de la misma manera que antes, se congeló a -80 °C en hielo seco y se liofilizó. El pre-gel liofilizado se esterilizó luego por exposición a gas EtO a una dosis de 750 mg/h durante 16 h y/o se reconstituyó en agua 50

desionizada o HCl de 0,01 N (figuras 16A-16D). Las figuras 16A-16D muestran la reconstitución completa a temperatura ambiente usando agua y HCl antes de la esterilización, pero después de la esterilización (figura 16D) solo el pre-gel en agua desionizada se reconstituyó completamente.

5 Como solo el pre-gel en agua desionizada se reconstituyó por completo, se analizó la formación de hidrogel en estas muestras. La figura 17 muestra que tanto el pre-gel no esterilizado como el esterilizado con EtO dieron como resultado un gel sólido cuando se neutralizó y se colocó en una incubadora a 37°C sin CO<sub>2</sub>, el cual mantuvo la forma después de retirar los moldes de anillo metálico.

10 A fin de corroborar los resultados mostrados en la figura 17, se descelularizó ECM derivada de la vejiga urinaria (UBM) de acuerdo con un protocolo estándar y se probó de la misma manera que la SIS-ECM anterior. Los resultados mostraron de manera similar que la esterilización del pre-gel liofilizado era propicia para la formación de hidrogel (figura 18).

**Ejemplo 17 - Esterilización de producto liofilizado – estudios adicionales**

15 Ampliando el trabajo de los Ejemplos anteriores, los materiales ECM, preparados esencialmente como se ha descrito anteriormente, se esterilizan en diferentes formas, como se indica a continuación: material de ECM que no se digiere, tanto en polvo como en láminas 2D; polvo hidratado o material de ECM en lámina 2D que no se digiere; solución de pre-gel que se digiere con proteasa ácida, pero no se neutraliza; y/o pre-gel liofilizado que se digiere, pero no se neutraliza. Se analizan materiales de ECM de diversas fuentes, incluyendo vejiga urinaria, bazo, hígado, corazón, páncreas, ovario, intestino delgado, sistema nervioso central (SNC), tejido adiposo y/o hueso.

20 Los materiales son esterilizados por óxido de etileno, radiación gamma (2kGy, 30kGy @ temperatura ambiente y -80 C), radiación de haz de electrones (2kGy, 30kGy @ temperatura ambiente y -80 C), y/o CO<sub>2</sub> supercrítico (bajo y/o alto). También se ejecuta un control no esterilizado.

**Ejemplo 18: Matriz de vejiga urinaria descelularizada (UBM) sometida a diversos procedimientos de esterilización**

25 La matriz de la vejiga urinaria se descelularizó de acuerdo con un protocolo estándar y se sometió a diversos procedimientos de esterilización. La formación de hidrogel se probó después de la esterilización de (1) la lámina de UBM, (2) polvo de UBM triturado mecánicamente y (3) después de la digestión y la liofilización. Cada gel se formó en un molde de anillo y se fotografió (fig. 19A). Luego se probó la formación de hidrogel con los hidrogeles más rígidos formados por los digeridos liofilizados, seguido de la forma de polvo, como se muestra por los valores del módulo de almacenamiento (ver fig. 19B). La esterilización de la lámina UBM no permitió la posterior formación de hidrogel. Cada procedimiento de esterilización tiene un impacto en la formación de hidrogel, pero esto puede mitigarse mediante la forma de partida del material de ECM, lo que se evidencia más claramente mediante una comparación de los módulos de almacenamiento de las formas de polvo liofilizado scCO<sub>2</sub> y EtO. De modo interesante, las muestras de control no esterilizadas también muestran una clara diferencia en la formación de hidrogel con el material digerido liofilizado formando un gel más rígido. Cualitativamente, el material digerido liofilizado formó el hidrogel más rígido seguido de polvo, mientras que la esterilización de la lámina de UBM no permitió la formación posterior de hidrogel. Las tendencias cualitativas en la rigidez del gel se corroboraron mediante la caracterización reológica de la rigidez del gel (es decir, el módulo de almacenamiento o G'). Juntas, estas cifras resaltan la importancia de la forma de ECM (es decir, lámina, polvo o material digerido) que está expuesta a la esterilización.

40 La presente invención se ha descrito de acuerdo con varios ejemplos, que pretenden ser ilustrativos, más que limitantes, en todos los aspectos. Por lo tanto, la presente invención es capaz de muchas variaciones en la puesta en práctica detallada, que pueden derivarse de la descripción contenida aquí por una persona de habilidad ordinaria en la técnica, y no debe estar limitada por la descripción anterior, sino que debe interpretarse con un alcance tan amplio como las siguientes reivindicaciones.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición de matriz extracelular (ECM) gelificable que comprende una matriz extracelular intacta, descelerizada, digerida enzimáticamente, secada y esterilizada en su fase final, en la que dicha composición es capaz de formar un gel tras hidratación, neutralización a pH 7,2 - 7,8 y calentamiento a una temperatura superior a 25°C, en la que la matriz extracelular es preferentemente bioactiva.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que la composición además comprende una proteasa preferentemente pepsina o tripsina.
- 10 3. La composición de la reivindicación 1 o 2, en la que la matriz extracelular se deriva de vejiga urinaria, bazo, hígado, corazón, páncreas, ovario, intestino delgado, intestino grueso, colon, tejido del sistema nervioso central, tejido adiposo o hueso.
4. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la matriz extracelular es de humano, mono, cerdo, vaca u oveja.
5. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicha composición es capaz de formar un gel cuando se calienta a 37°C.
- 15 6. Una solución de digestión de matriz extracelular (ECM) esterilizada terminalmente que comprende la composición de matriz extracelular gelificable de la reivindicación 1, en la que la composición está hidratada, y en la que la solución de digestión es capaz de formar un gel tras la neutralización a pH 7,2 - 7,8 y el calentamiento a una temperatura superior a 25°C, en la que la matriz extracelular es preferentemente bioactiva.
- 20 7. La composición de la reivindicación 6, en la que la composición comprende una proteasa, preferentemente pepsina o tripsina.
8. La composición de la reivindicación 6 o 7, en la que la matriz extracelular se deriva de vejiga urinaria, bazo, hígado, corazón, páncreas, ovario, intestino delgado, intestino grueso, colon, tejido del sistema nervioso central, tejido adiposo o hueso.
- 25 9. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en la que la matriz extracelular es de humano, mono, cerdo, vaca u oveja.
10. Una solución de digestión de matriz extracelular (ECM) esterilizada de forma terminal que comprende la composición de matriz extracelular gelificable de la reivindicación 1, en la que dicha composición está hidratada y dicha solución de digestión tiene un pH de 7,2 - 7,8 y forma un gel cuando se calienta a una temperatura superior a 25°C, en la que la matriz extracelular es preferentemente bioactiva.
- 30 11. La composición de la reivindicación 10, en la que la composición forma un gel cuando se calienta a 37°C.
12. La composición de la reivindicación 10 o 11, en la que la matriz extracelular se deriva de vejiga urinaria, bazo, hígado, corazón, páncreas, ovario, intestino delgado, intestino grueso, colon, tejido del sistema nervioso central, tejido adiposo o hueso.
- 35 13. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en la que la matriz extracelular es de humano, mono, cerdo, vaca u oveja.
14. Un producto obtenible por un procedimiento que comprende las etapas:
  - (i) solubilizar la matriz extracelular (ECM) que no ha sido dializada ni sometida a un proceso de reticulación, mediante digestión con una proteasa ácida en una solución ácida para producir una solución de material digerido;
  - 40 (ii) secar la solución de material digerido para producir un material digerido seco; y
  - (iii) esterilización final del digerido seco para producir un digerido seco esterilizado,
 en el que el ECM no se esteriliza antes de la etapa de solubilización.
15. Un producto obtenible por un procedimiento que comprende las etapas:
  - 45 (i) solubilizar la matriz extracelular (ECM) que no ha sido dializada ni sometida a un proceso de reticulación, mediante digestión con una proteasa ácida en una solución ácida para producir una solución de material digerido;
  - (ii) secar la solución de material digerido para producir un material digerido seco; y
  - (iii) esterilización final del digerido seco para producir un digerido seco esterilizado, en el que el ECM no se esteriliza antes de la etapa de solubilización;
  - 50 (iv) hidratar y neutralizar el material digerido seco esterilizado a un pH entre 7,2 y 7,8 para producir una solución de material digerido neutralizado; y

(v) gelificar la solución de material digerido neutralizado a una temperatura superior a 25 °C para producir un gel.

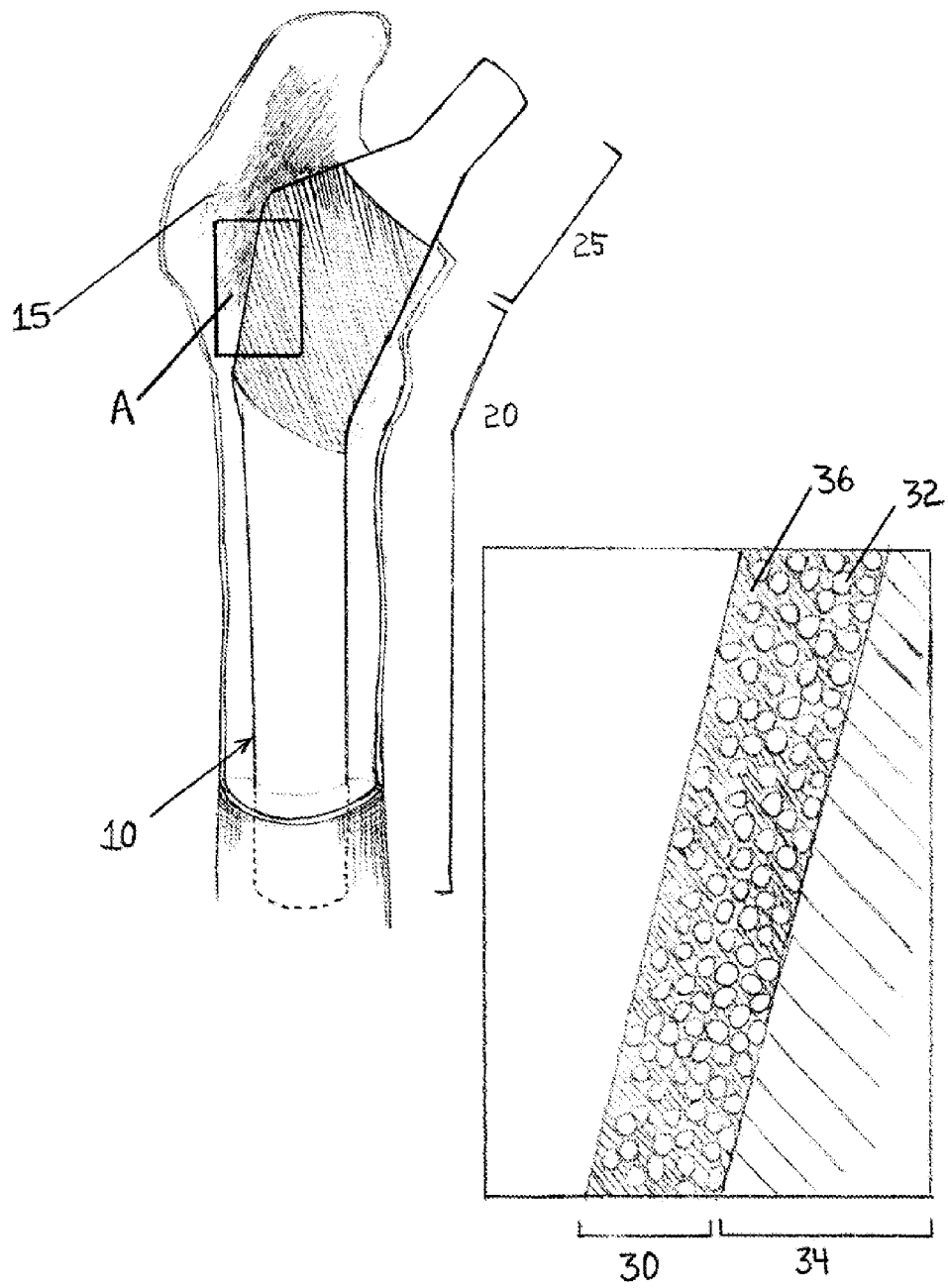
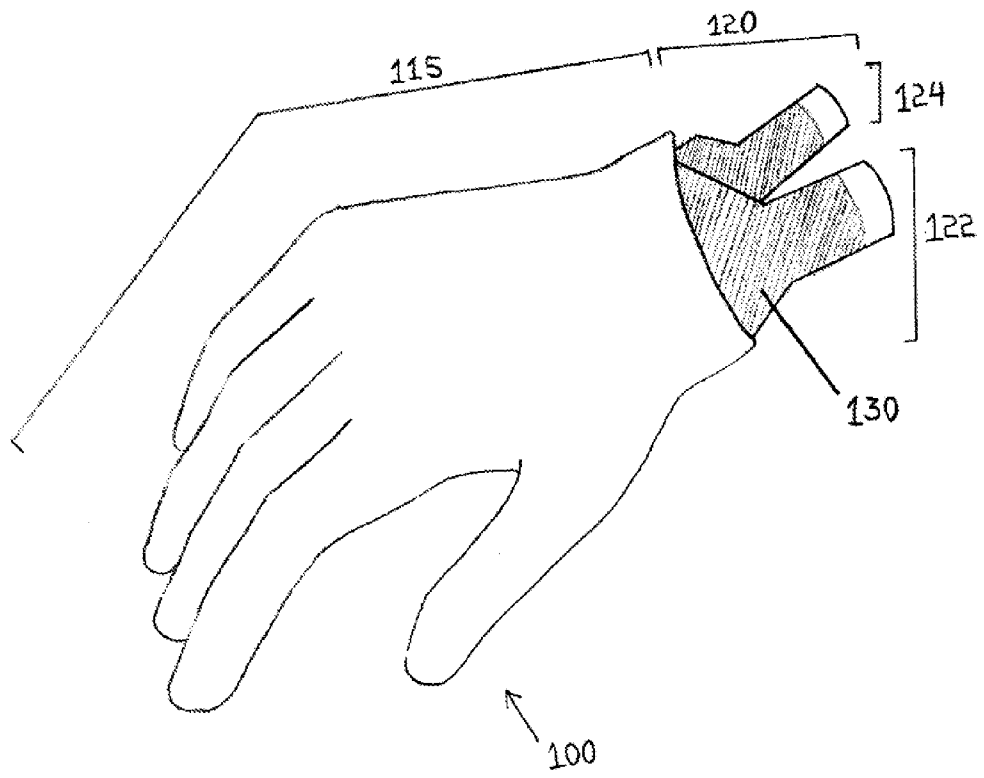
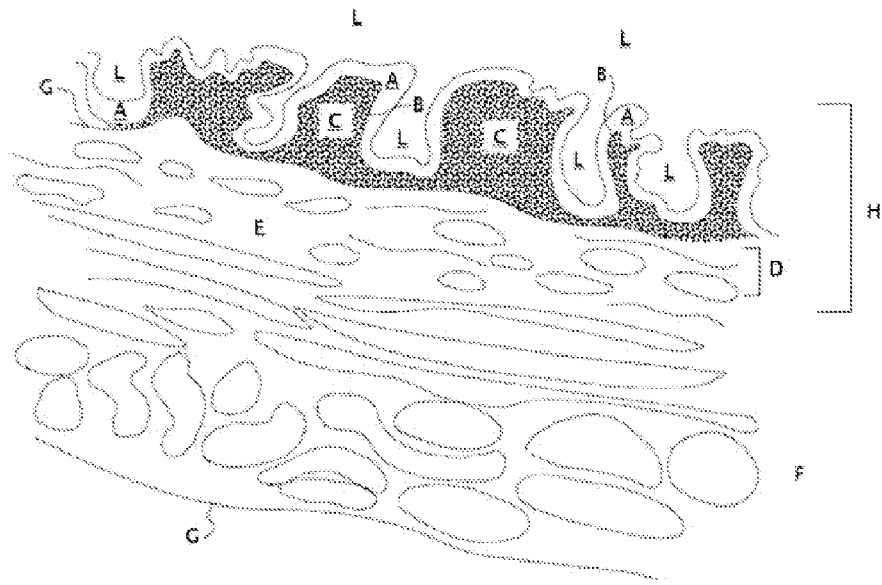


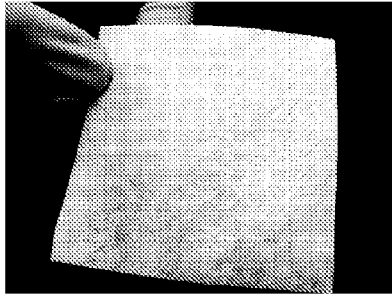
Fig. 1



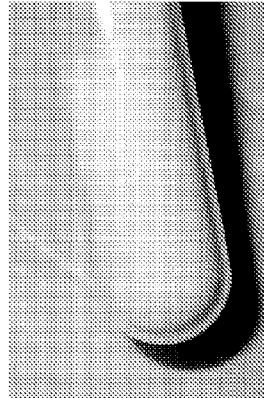
**Fig. 2**



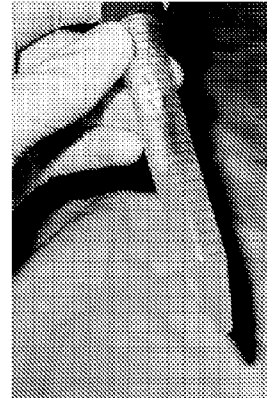
**Fig. 3**



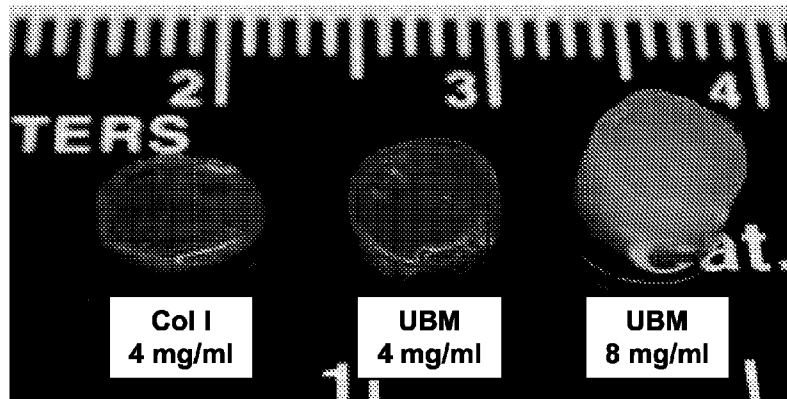
**Fig. 4A**



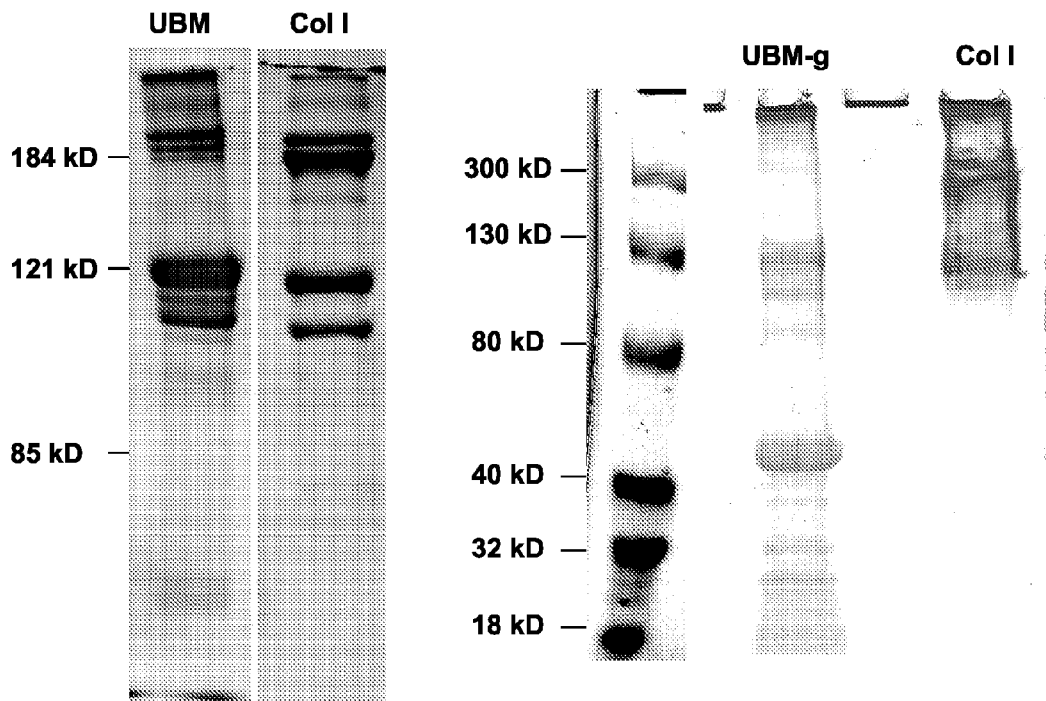
**Fig. 4B**



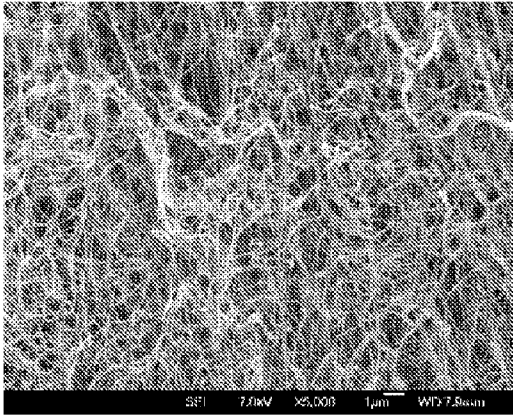
**Fig. 4C**



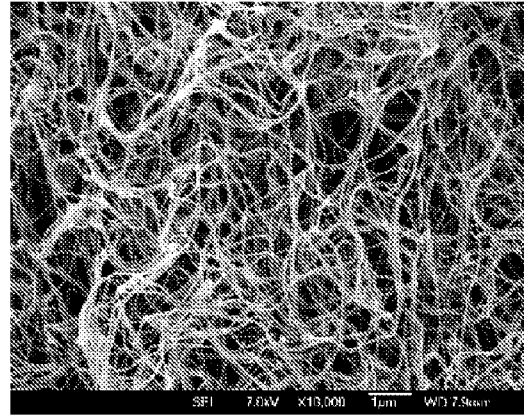
**Fig. 4D**



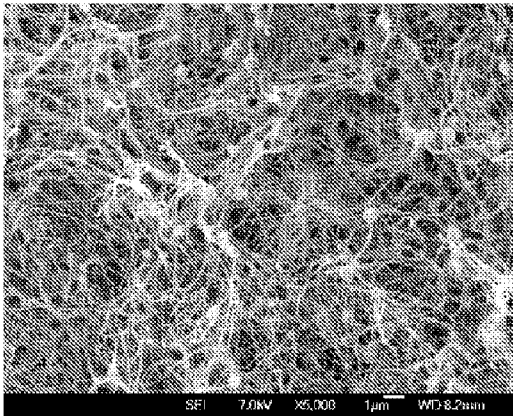
**Fig. 5**



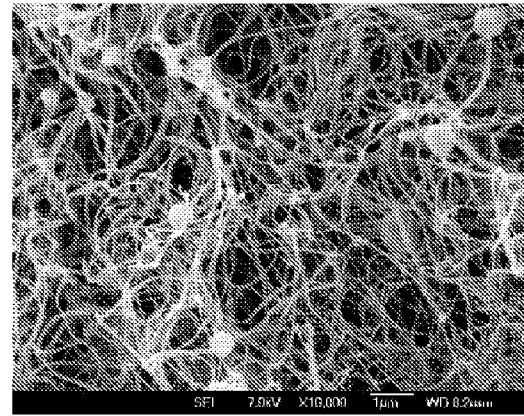
**Fig. 6A**



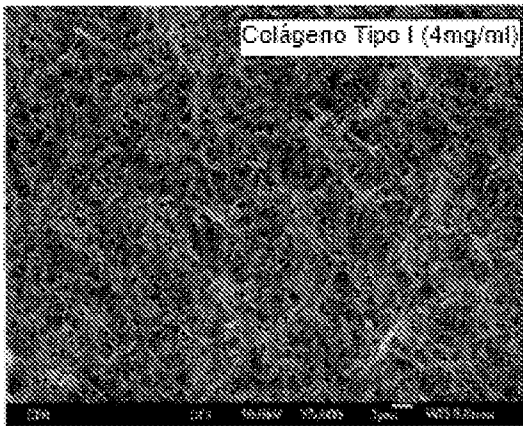
**Fig. 6B**



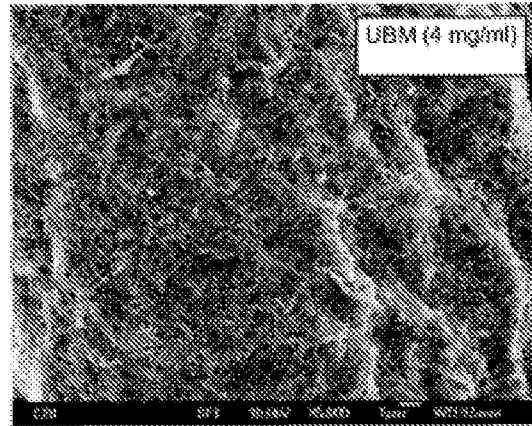
**Fig. 6C**



**Fig. 6D**



**Fig. 7A**



**Fig 7B**

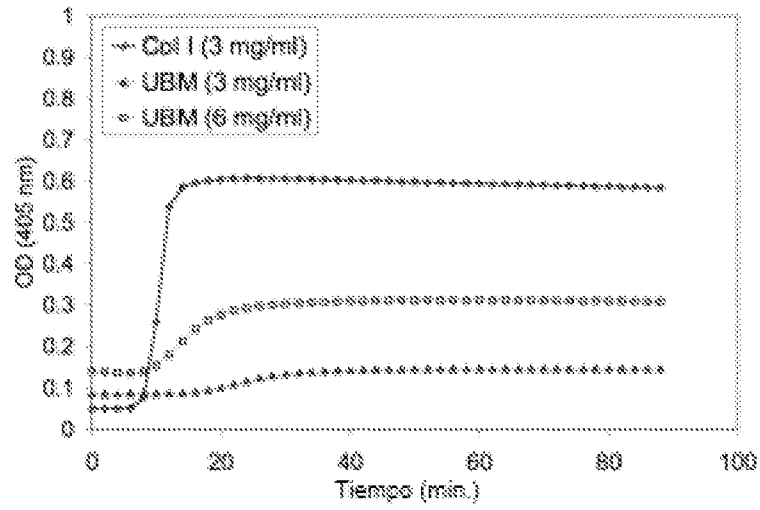


Fig. 8A

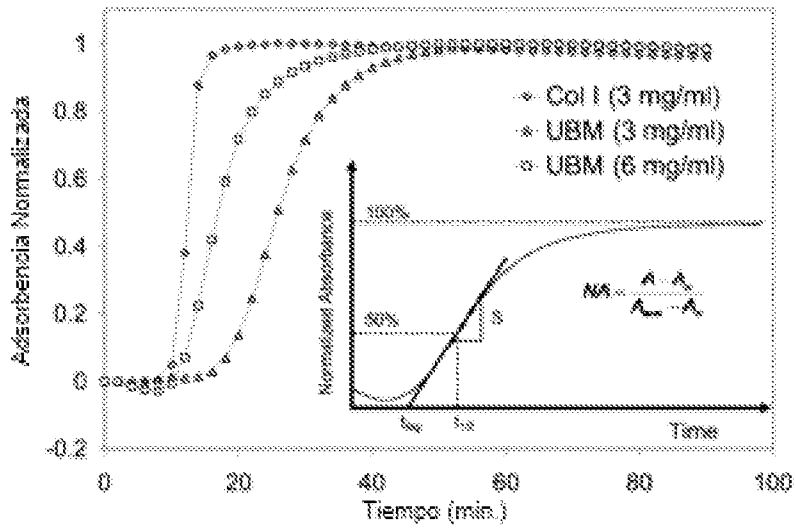


Fig. 8B

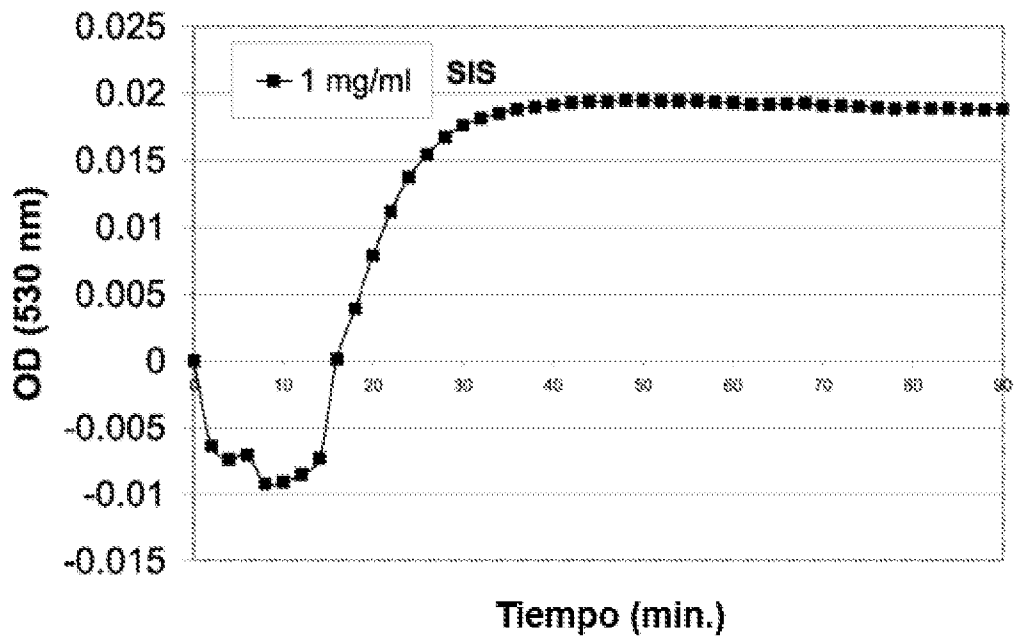


Fig. 9

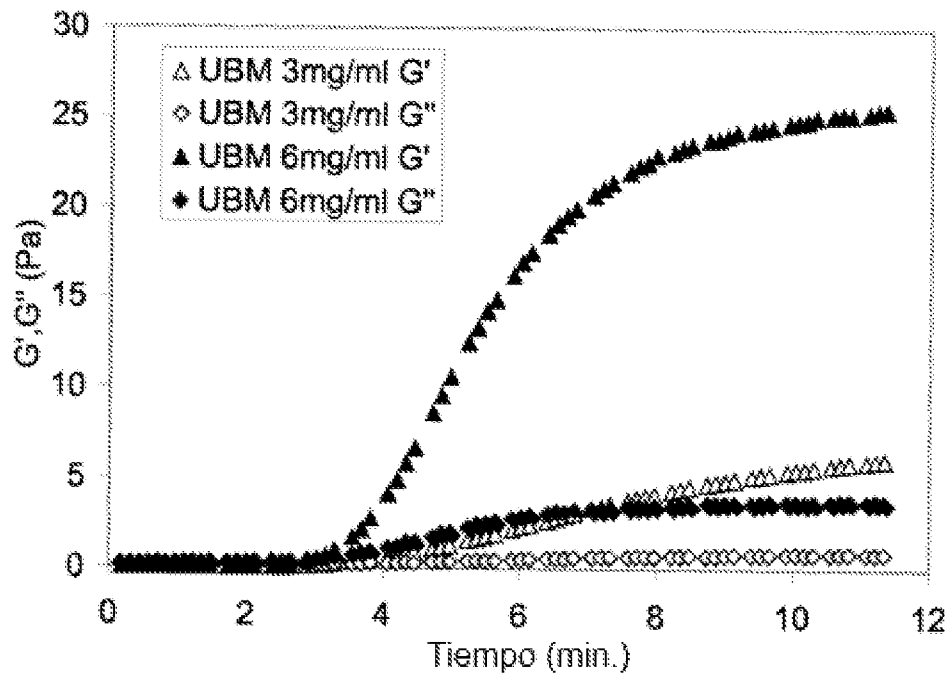


Fig. 10

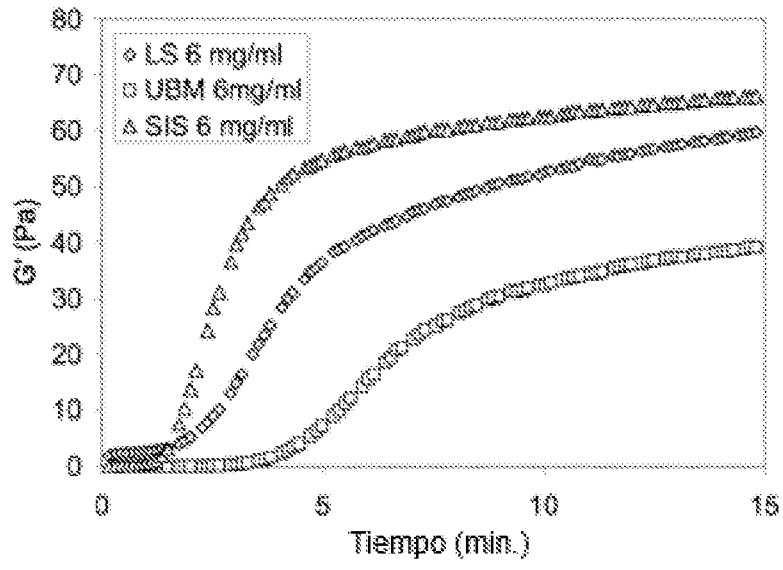


Fig. 11A

$G'$  vs. Frecuencia Angular

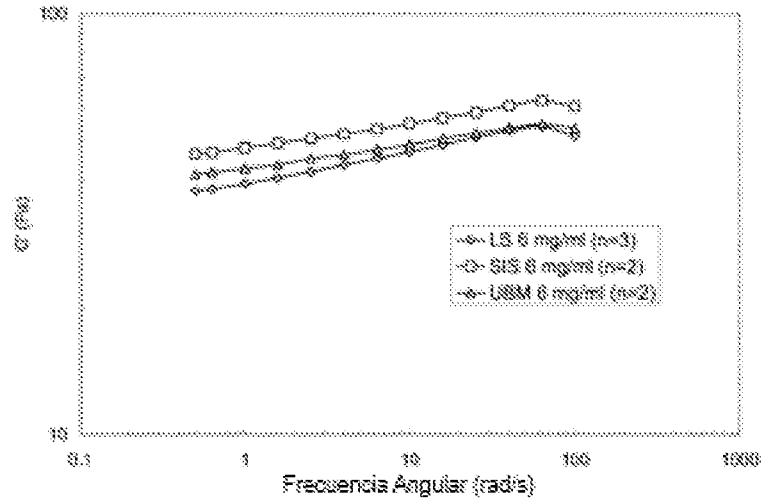


Fig. 11B

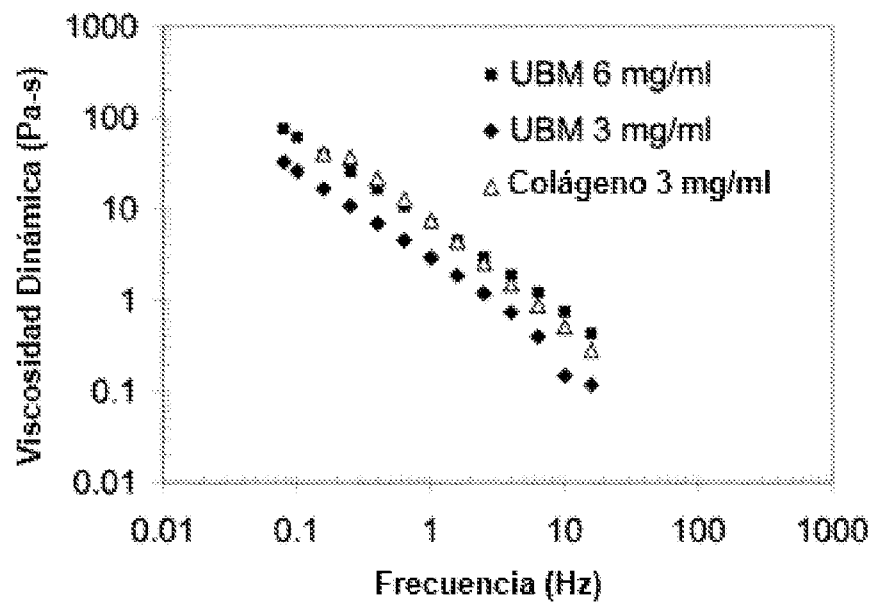
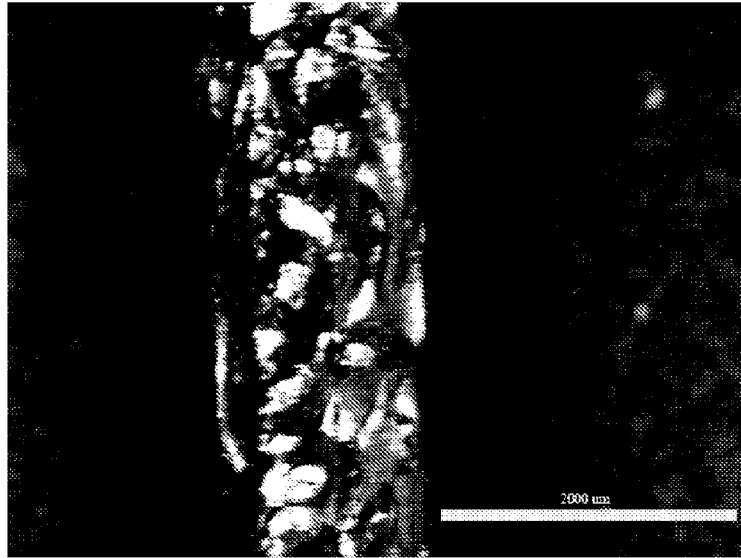


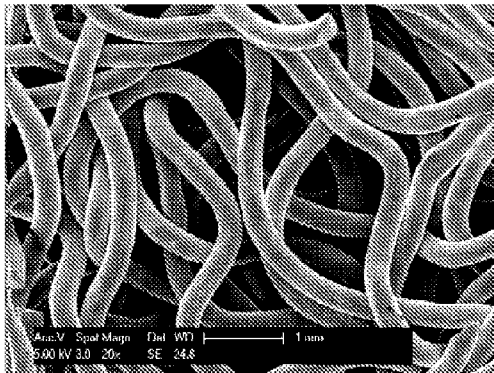
Fig. 12



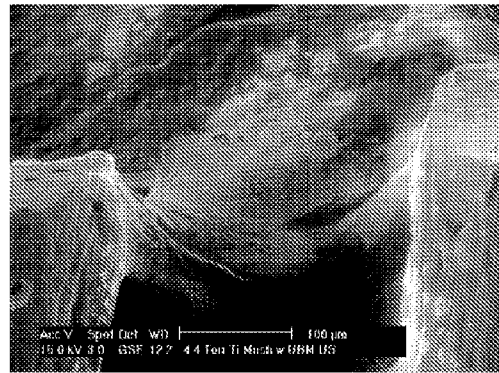
**Fig. 13A**



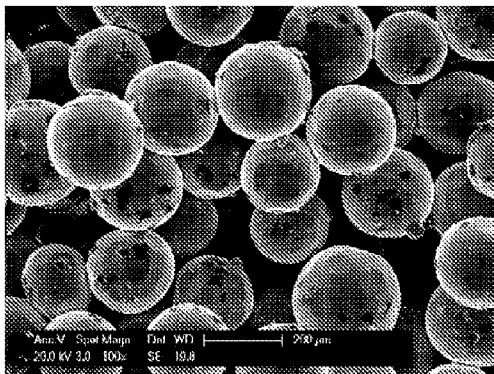
**Fig. 13B**



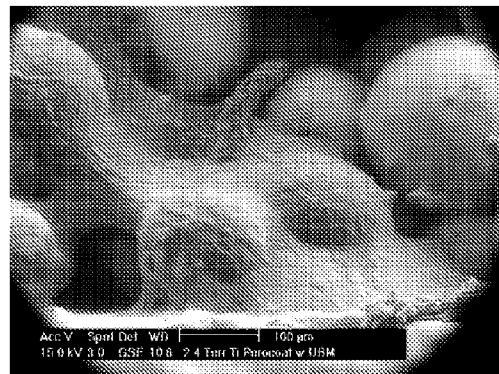
**Fig. 14A**



**Fig. 14B**



**Fig. 14C**



**Fig. 14D**

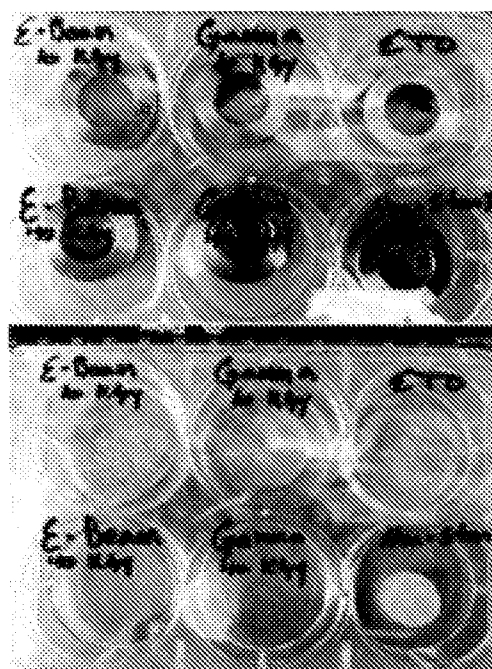


Fig. 15



liofilizado	0,01N HCl reconstituido	ddH <sub>2</sub> O reconstituido	EtO esterilizado: reconstituido en agua
-------------	-------------------------	----------------------------------	---

Fig. 16A

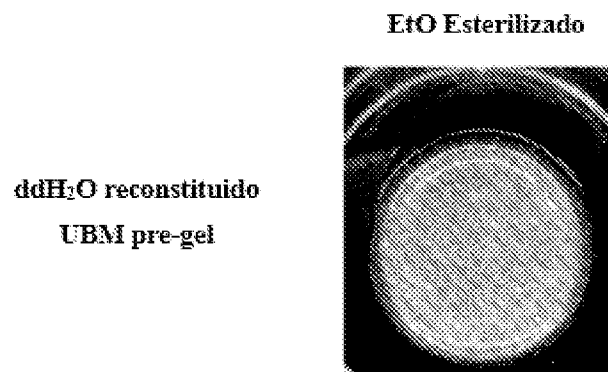
Fig. 16B

Fig. 16C

Fig. 16D



**Fig. 17**



**Fig. 18**

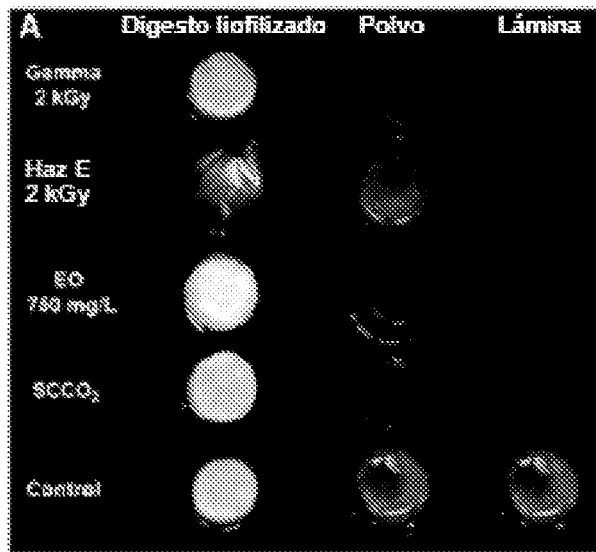


Fig. 19A

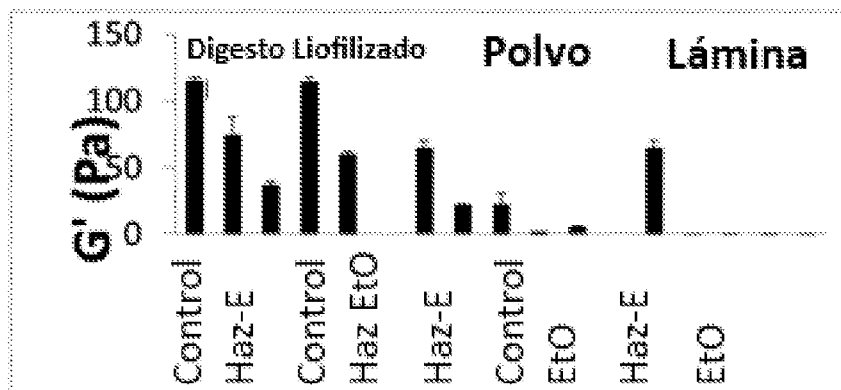


Fig. 19B