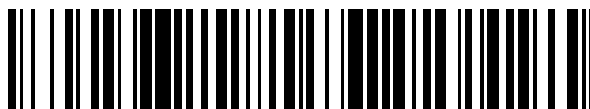


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 714 365**

51 Int. Cl.:

A61L 27/18 (2006.01)

A61L 27/16 (2006.01)

A61L 27/36 (2006.01)

A61L 31/00 (2006.01)

C08L 89/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2008 E 15197130 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2018 EP 3011962**

54 Título: **Composiciones acelulares de matriz tisular para reparación de tejidos**

30 Prioridad:

10.07.2007 US 948793 P

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

28.05.2019

73 Titular/es:

**LIFECCELL CORPORATION (100.0%)
5 Giralda Farms
Madison, New Jersey 07940, US**

72 Inventor/es:

**OWENS, RICK T y
SUN, WENDELL**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 714 365 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

Composiciones acelulares de matriz tisular para reparación de tejidos

5 Campo técnico

Esta invención se refiere al diseño genético de tejidos, y más particularmente a un material que puede ser implantado en, o injertado en, sujetos vertebrados para reparación o mejora de tejidos defectuosos o deteriorados.

10 Antecedentes

Los organismos multicelulares, con inclusión de los mamíferos, están constituidos por tejidos, es decir, agregados organizados de grupos de células especializados de forma y función similares. En muchos tipos de tejidos, las células están rodeadas también por una matriz extracelular (ECM), una mezcla compleja de carbohidratos y proteínas que proporciona soporte y anclaje para las células. Cuando los tejidos se deterioran, debe tener lugar de manera oportuna una serie ordenada de eventos fisiológicos para que se produzca una regeneración satisfactoria del tejido. Los primeros eventos, denominados como la fase inflamatoria, incluyen coagulación de la sangre así como la llegada al sitio de la herida de células que eliminan bacterias, residuos y tejido deteriorado. Más tarde, citoblastos circulantes migran al sitio de la lesión y se diferencian en tipos de células específicos de tejido. Por último, las células diferenciadas comienzan a producir y depositar ECM nueva.

La reparación con éxito del tejido defectuoso o deteriorado depende en parte de proporcionar condiciones que permitan la regeneración celular apropiada y que minimicen la probabilidad de infección durante el proceso de reparación.

25 El documento US 2003/225355 divulga un material compuesto poroso que comprende una malla de polipropileno que está cubierta por ambas caras por una matriz dérmica de tejido acelular o con un coprecipitado criodeseado de una dispersión de colágeno bovino en ácido acético y condroitina-6-sulfato. La malla está prevista para su uso en la reparación de heridas, por ejemplo, defectos o hernias abdominales.

30 Sumario

Los inventores han descubierto que fragmentos de una matriz dérmica de tejido acelular (ATM), hinchada en una solución ácida, puede secarse para producir una composición biocompatible de reparación de tejidos. En realizaciones preferidas, la suspensión de ATM en solución ácida se calienta a temperaturas moderadamente elevadas antes del secado. Tales composiciones biocompatibles de reparación de tejidos pueden proporcionar un medio de reparación de tejidos múltiples defectuosos o deteriorados al tiempo que minimizan la promoción de adhesiones o infección.

Más específicamente, se proporciona un método de producción de una composición de malla biocompatible de acuerdo con la reivindicación independiente 1. El método incluye: a) incubar una pluralidad de fragmentos de una matriz dérmica de tejido acelular (ATM) en una solución ácida para crear una suspensión homogénea de fragmentos de ATM hinchados, en el que la solución ácida tiene un pH menor que 3,0 y no produce una desnaturalización irreversible sustancial de fibras de colágeno en la ATM; en el que la ATM comprende un tejido dérmico del que se han eliminado todas, o prácticamente todas, las células viables; b) aplicar la suspensión homogénea a un sustrato de malla sintética biocompatible para crear un sustrato de malla sintética recubierto; y c) secar el sustrato de malla sintética biocompatible recubierto para formar una composición de malla sintética biocompatible. Los pasos (a) y (b) pueden realizarse simultáneamente.

La ATM incluye la dermis de la que se han eliminado todas, o prácticamente todas, las células viables. La ATM puede estar hecha de tejido humano o tejido de mamífero no humano. El mamífero no humano puede ser un cerdo. En un aspecto, el mamífero no humano puede estar diseñado genéticamente de modo que carezca de la expresión de restos de α -1,3-galactosilo. El mamífero no humano puede carecer de un gen de α -1,3-galactosiltransferasa funcional. Los fragmentos de ATM pueden ser partículas de ATM.

El pH de la solución ácida puede ser inferior a aproximadamente 3,0. El pH puede ser de aproximadamente 1,0 a 3,0, de aproximadamente 2,0 a 3,0 o de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2,5. El pH puede ser aproximadamente 1,4. En otro aspecto, la solución ácida puede ser una solución que comprende un ácido seleccionado del grupo constituido por ácido acético, ácido ascórbico, ácido bórico, ácido carbónico, ácido cítrico, ácido clorhídrico, ácido láctico, ácido tánico, ácido fosfórico, y ácido sulfúrico. La solución ácida puede incluir ácido acético 0,1 M. La solución ácida puede incluir ácido clorhídrico 0,04 M.

En un aspecto, la etapa de incubación puede realizarse durante un periodo de aproximadamente 0,5 horas a aproximadamente 12 horas. La etapa de incubación puede tener lugar durante un periodo de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 10,0 horas, de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 6 horas, o de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 5 horas. La etapa de incubación puede tener lugar durante un periodo de aproximadamente 3 horas.

En un aspecto, la incubación, el secado, o la incubación y el secado pueden realizarse a una temperatura de aproximadamente 20°C a aproximadamente 42°C. La temperatura puede ser de aproximadamente 20°C a aproximadamente 30°C, de aproximadamente 25°C a aproximadamente 35°C, de aproximadamente 30°C a aproximadamente 40°C, de aproximadamente 35°C a aproximadamente 38°C, o de aproximadamente 37°C a aproximadamente 42°C. La temperatura puede ser aproximadamente 37°C. La temperatura puede ser aproximadamente 25°C.

En un aspecto, el sustrato de malla puede ser sustancialmente no absorbible. En otro aspecto, el sustrato de malla puede ser absorbible. La malla absorbible puede ser un polímero seleccionado del grupo constituido por polihidroxialcanoato, ácido poliglicólico, ácido poli-1-láctico, ácido poliláctico/poliglicólico (PLGA), poliglactina 910 y carboximetilcelulosa.

El polímero puede incluir poli-4-hidroxibutirato. El sustrato de malla es un sustrato sintético; el sustrato sintético puede incluir polipropileno.

En otro aspecto, el secado puede incluir secado en una atmósfera de nitrógeno o liofilización.

En otro aspecto, el método de producción de una composición de malla biocompatible puede incluir: a) incubar una pluralidad de fragmentos de una matriz dérmica acelular de porcino durante aproximadamente 3 horas a una temperatura de aproximadamente 37°C en una solución de ácido acético 0,1 M para crear una suspensión homogénea de fragmentos hinchados, en el que la solución ácida tiene un pH de aproximadamente 2,6 y no produce desnaturalización irreversible sustancial de las fibras de colágeno en la matriz dérmica acelular de porcino; b) aplicar la suspensión homogénea a un sustrato de malla de polipropileno biocompatible para crear un sustrato de malla recubierto; y c) secar el sustrato recubierto en una atmósfera de nitrógeno para formar una composición de malla.

En otra realización, la invención proporciona una composición de malla biocompatible producida por a) incubación de una pluralidad de fragmentos de una ATM dérmica en una solución ácida para crear una suspensión homogénea de fragmentos de ATM hinchados, en donde la solución ácida tiene un pH menor que 3,0 y no causa desnaturalización irreversible sustancial de las fibras de colágeno en la ATM; b) aplicar la suspensión homogénea a un sustrato de malla biocompatible para crear un sustrato de malla recubierto; y c) secar el sustrato recubierto para formar una composición de malla. Los pasos (a) y (b) pueden realizarse simultáneamente.

La ATM es, o incluye, la dermis de la que se han eliminado todas, o prácticamente todas, las células viables. La ATM puede estar hecha de tejido humano o tejido de mamífero no humano. El mamífero no humano puede ser un cerdo. En algunas realizaciones, el mamífero no humano puede estar diseñado genéticamente de tal modo que carezca de restos de α -galactosilo. El mamífero no humano puede carecer de un gen de α -1,3-galactosiltransferasa funcional. Los fragmentos de ATM pueden ser partículas de ATM.

El pH de la solución ácida puede ser inferior a aproximadamente 3,0. El pH puede ser de aproximadamente 1,0 a menos de 3,0, de aproximadamente 2,0 a menos de 3,0 o de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2,5. El pH puede ser aproximadamente 1,4. En otro aspecto, la solución ácida puede ser una solución que comprende un ácido seleccionado del grupo constituido por ácido acético, ácido ascórbico, ácido bórico, ácido carbónico, ácido cítrico, ácido clorhídrico, ácido láctico, ácido tánico, ácido fosfórico, y ácido sulfúrico. La solución ácida puede incluir ácido acético 0,1 M. La solución ácida puede incluir ácido clorhídrico 0,04 M.

En un aspecto, la etapa de incubación puede realizarse durante un periodo de aproximadamente 0,5 horas a aproximadamente 12 horas. La etapa de incubación puede tener una duración de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 10,0 horas. La etapa de incubación puede tener una duración de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 6 horas o de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 5 horas. La etapa de incubación puede tener lugar durante un periodo de aproximadamente 3 horas.

En un aspecto, la incubación, el secado, o la incubación y el secado pueden efectuarse a una temperatura de aproximadamente 20°C a aproximadamente 42°C. La temperatura puede ser de aproximadamente 20°C a aproximadamente 30°C, de aproximadamente 25°C a aproximadamente 35°C, de aproximadamente 30°C a aproximadamente 40°C, de aproximadamente 35°C a aproximadamente 38°C, o de aproximadamente 37°C a aproximadamente 42°C. La temperatura puede ser aproximadamente 37°C. La temperatura puede ser aproximadamente 25°C.

En un aspecto, el sustrato de malla puede ser sustancialmente no absorbible. En otro aspecto, el sustrato de malla puede ser absorbible. La malla absorbible puede ser un polímero seleccionado del grupo constituido por polihidroxialcanoato, ácido poliglicólico, ácido poli-1-láctico, ácido poliláctico/poliglicólico (PLGA), poliglactina 910 y carboximetilcelulosa. El polímero puede incluir poli-4-hidroxibutirato. El sustrato de malla es un sustrato sintético; el sustrato sintético puede incluir polipropileno.

En otro aspecto, el secado puede incluir secado en una atmósfera de nitrógeno o liofilización.

En otra realización, se proporciona una composición de malla biocompatible. La composición incluye un sustrato de malla recubierto, en el que el recubrimiento del sustrato de maya incluye una suspensión de ATM dérmica seca. En un aspecto, la composición incluye una suspensión de ATM que incluye una pluralidad de fragmentos de una matriz dérmica de tejido acelular (ATM) hinchados en una solución ácida, en el que la solución ácida tiene un pH menor que 3,0 y no produce una desnaturalización irreversible sustancial de las fibras de colágeno de la ATM, y en el que los fragmentos de ATM se incuban a una temperatura de aproximadamente 30°C a aproximadamente 42°C.

La ATM es, o incluye, la dermis de la que se han eliminado todas, o prácticamente todas, las células viables. La ATM puede estar hecha de tejido humano o tejido de mamífero no humano. El mamífero no humano puede ser un cerdo. En algunas realizaciones, el mamífero no humano puede estar diseñado genéticamente de tal modo que carezca de restos de α -galactosilo. El mamífero no humano puede carecer de un gen de α -1,3-galactosiltransferasa funcional. Los fragmentos de ATM pueden ser partículas de ATM.

El pH de la solución ácida es inferior a aproximadamente 3,0. El pH puede ser de aproximadamente 1,0 a menos de 3,0, aproximadamente 2,0 a menos de 3,0 o de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2,5. El pH puede ser aproximadamente 1,4. En otro aspecto, la solución ácida puede ser una solución que comprende un ácido seleccionado del grupo constituido por ácido acético, ácido ascórbico, ácido bórico, ácido carbónico, ácido cítrico, ácido clorhídrico, ácido láctico, ácido tánico, ácido fosfórico, y ácido sulfúrico. La solución ácida puede incluir ácido acético 0,1 M. La solución ácida puede incluir ácido clorhídrico 0,04 M.

En un aspecto, la etapa de incubación puede realizarse durante un periodo de aproximadamente 0,5 horas a aproximadamente 12 horas. La etapa de incubación puede tener una duración de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 10,0 horas. La etapa de incubación puede tener una duración de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 6 horas o de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 5 horas. La etapa de incubación puede tener una duración de aproximadamente 3 horas.

En un aspecto, la incubación, el secado, o la incubación y el secado pueden efectuarse a una temperatura de aproximadamente 20°C a aproximadamente 42°C. La temperatura puede ser de aproximadamente 20°C a aproximadamente 30°C, de aproximadamente 25°C a aproximadamente 35°C, de aproximadamente 30°C a aproximadamente 40°C, de aproximadamente 35°C a aproximadamente 38°C, o de aproximadamente 37°C a aproximadamente 42°C. La temperatura puede ser aproximadamente 37°C. La temperatura puede ser aproximadamente 25°C.

En un aspecto, el sustrato de malla puede ser sustancialmente no absorbible. En otro aspecto, el sustrato de malla puede ser absorbible. La malla absorbible puede ser un polímero seleccionado del grupo constituido por polihidroxialcanoato, ácido poliglicólico, ácido poli-1-láctico, ácido poliláctico/poliglicólico (PLGA), poliglactina 910 y carboximetilcelulosa. El polímero puede incluir poli-4-hidroxibutirato. El sustrato de malla es un sustrato sintético; el sustrato sintético puede incluir polipropileno.

En otro aspecto, el secado puede incluir secado en una atmósfera de nitrógeno o liofilización.

En otra realización, la invención proporciona la composición de malla biocompatible de la invención para su uso en un método de mejora o reparación de un órgano o tejido. El método incluye a) identificar un sujeto mamífero que tiene un órgano o tejido que precisa mejora o reparación; y b) colocar cualquiera de las composiciones biocompatibles de malla anteriormente descritas en el interior o en la superficie del órgano o tejido. El sujeto mamífero puede ser humano. El órgano o tejido receptor puede seleccionarse del grupo constituido por tejido de la pared abdominal, músculo abdominal, y tejido de musculatura lisa. El sujeto puede tener un defecto que precisa reparación seleccionado del grupo constituido por una hernia inguinal, una hernia femoral, una hernia ventral, una hernia abdominal, una hernia incisional, una hernia de hiato, una hernia de diafragma, una hernia umbilical, debilidad fascial en el tórax, debilidad fascial en la pared abdominal, y prolapso de órgano pélvico.

En los métodos, composiciones, y artículos de fabricación anteriormente descritos, las realizaciones citadas pueden combinarse en cualquier combinación deseada.

A no ser que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en esta memoria tienen el mismo significado que es entendido comúnmente por una persona con experiencia ordinaria en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en esta memoria en la práctica o los ensayos de la presente invención, se describen a continuación métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, con inclusión de las definiciones. Adicionalmente, los materiales, métodos, y ejemplos son únicamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en los dibujos que se acompañan y la descripción que sigue. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y de las reivindicaciones.

Descripción detallada

Los materiales y métodos proporcionados en esta memoria pueden utilizarse para producir una composición biocompatible de reparación de tejidos que puede implantarse en un órgano o tejido deteriorado o defectuoso para facilitar la reparación del órgano o tejido deteriorado o defectuoso. Como se utiliza en esta memoria, una composición "biocompatible" es una que tiene la capacidad de soportar la actividad celular necesaria para la regeneración completa o parcial del tejido, pero no estimula una respuesta inflamatoria o inmunológica local o sistémica significativa en el hospedador. Como se utiliza en esta memoria, una "respuesta inflamatoria o inmunológica local o sistémica significativa en el hospedador" es una respuesta inflamatoria o inmunológica local o sistémica que previene parcial o completamente la regeneración del tejido por una composición de la invención.

I. Componentes de la Composición

La composición de la invención se produce por hinchamiento de fragmentos de ATM en una solución ácida seguido por secado de la suspensión de fragmentos de ATM hinchados resultantes, preferiblemente sobre una superficie, o ambas superficies, de un sustrato de malla. Se contempla también el recubrimiento de dispositivos médicos implantables con las composiciones proporcionadas en esta memoria con objeto de atenuar una respuesta de tejido extraño. Ejemplos de dispositivos adecuados incluyen, sin limitación, articulaciones artificiales, injertos vasculares, válvulas artificiales, marcapasos cardíacos, desfibriladores cardíacos, estimuladores musculares, estimuladores neurológicos, implantes cocleares, dispositivos de monitorización, bombas de fármaco y dispositivos de asistencia al ventrículo izquierdo.

Matrices de tejido acelulares

Como se utiliza en esta memoria, una "matriz de tejido acelular" ("ATM") es una estructura derivada de tejido que está hecha a partir de cualquiera de una amplia gama de tejidos que contienen colágeno por eliminación de todas, o sustancialmente todas las células viables y, preferiblemente, todas las células muertas detectables, componentes subcelulares y/o residuos generados por células muertas o moribundas. Como se utiliza en esta memoria, una "matriz acelular" es una matriz que: (a) está hecha de cualquiera de una amplia gama de tejidos basados en colágeno; (b) es acelular; y (c) retiene las funciones biológicas y estructurales que tiene el tejido u órgano nativo a partir del cual se ha producido. Las funciones biológicas retenidas por las matrices incluyen el reconocimiento de células y la fijación de células así como la capacidad de soportar la propagación de células, proliferación de células, y diferenciación de células. Tales funciones se proporcionan mediante proteínas de colágeno no desnaturalizadas (por ejemplo, colágeno tipo I) y una diversidad de moléculas distintas de colágeno (por ejemplo, proteínas que sirven como ligandos para moléculas tales como receptores de integrinas, moléculas con alta densidad de carga tales como glicosaminoglicanos (por ejemplo, hialuronano) o proteoglicanos, u otras adhesinas). Las funciones estructurales retenidas por matrices acelulares útiles incluyen mantenimiento de la arquitectura histológica, mantenimiento de la red tridimensional de los componentes del tejido y características físicas tales como resistencia, elasticidad, y durabilidad, porosidad definida, y retención de macromoléculas. La eficiencia de las funciones biológicas de una matriz acelular puede medirse, por ejemplo, por su capacidad para soportar la proliferación celular, y es al menos un 50% (por ejemplo, al menos: 50%; 60%; 70%; 80%; 90%; 95%; 98%; 99%; 99,5%; 100%; o más de 100%) de las del tejido u órgano nativo del que está hecha la matriz acelular. Adicionalmente, la integridad de la membrana basal en las matrices acelulares, según se mide por microscopía electrónica y/o inmunohistoquímica, es al menos un 70% de la del tejido u órgano nativo a partir del cual se ha producido la matriz acelular. Como se utiliza en esta memoria, una ATM que carece de "sustancialmente de todas las células viables" es una ATM en la cual la concentración de células viables es menor que 1% (por ejemplo, menor que: 0,1%; 0,01%; 0,001%; 0,0001%; 0,00001%; 0,000001%; o 0,0%) de la existente en el tejido u órgano a partir del cual se ha producido la ATM. Las ATM útiles para la invención carecen también preferentemente sustancialmente de células muertas y/o residuos celulares que puedan estar presentes después de la destrucción de las células en la ATM. Una ATM "que carece sustancialmente de células muertas y/o residuos celulares" es una que contiene menos de 10% (a saber, menos de: 8%; 5%; 1%; 0,1%; 0,001%; 0,0001%; o menos) de las células muertas y/o residuos celulares presentes en la ATM después de un proceso de eliminación de células.

Las ATM producidas a partir de dermis se denominan en esta memoria, en algunos casos, como "matrices dérmicas acelulares" ("ADM").

La ATM de la invención puede tener o carecer de una membrana basal epitelial. La membrana basal epitelial es una lámina delgada de matriz extracelular contigua con el aspecto basilar de las células epiteliales. Las láminas de células epiteliales agregadas forman un epitelio. Así, por ejemplo, el epitelio de la piel se conoce como la epidermis, y la membrana basal epitelial de la piel está comprendida entre la epidermis y la dermis. La membrana basal epitelial es una matriz extracelular especializada que proporciona una función de barrera y una superficie de fijación para las células de tipo epitelial; sin embargo, no aporta papel estructural o biomecánico significativo alguno al tejido subyacente (por ejemplo, la dermis). Componentes singulares de membranas basales epiteliales incluyen, por ejemplo, laminina, colágeno tipo VII y nidógeno. La organización singular temporal y espacial de la membrana basal epitelial distingue la misma de, por ejemplo, la matriz dérmica extracelular. En algunas realizaciones, la presencia de la membrana basal epitelial en una ATM podría ser desventajosa en el sentido de que la membrana basal epitelial puede contener una diversidad de componentes específicos de especie que podrían suscitar la producción de anticuerpos, y/o fijarse a anticuerpos preformados, en receptores de injerto xenógenos de la matriz acelular. Adicionalmente, la membrana basal epitelial puede actuar como barrera para la difusión de células y/o factores

solubles (por ejemplo, quimioatrayentes) y la infiltración celular. Su presencia en una ATM puede retardar así significativamente la formación de tejido nuevo a partir de la ATM en un animal receptor. Como se utiliza en esta memoria, una ATM que "carece sustancialmente" de una membrana basal epitelial es una matriz de tejido acelular que contiene menos de 5% (por ejemplo, menos de: 3%; 2%; 1%; 0,5%; 0,25%; 0,1%; 0,01%; 0,001%; o incluso menos de 0,001%) de la membrana basal epitelial que tiene el tejido no procesado correspondiente del cual se ha derivado la ATM.

Las ATM retienen los atributos biológicos y estructurales de los tejidos a partir de los cuales se han producido, con inclusión del reconocimiento celular y fijación de células así como la capacidad para soportar la diseminación celular, la proliferación celular, y la diferenciación celular. Tales funciones se proporcionan mediante proteínas de colágeno no desnaturalizadas (por ejemplo, colágeno tipo I) y una diversidad de moléculas distintas de colágeno (por ejemplo, proteínas que sirven como ligandos para moléculas tales como receptores de integrinas, moléculas con alta densidad de carga tales como glicosaminoglicanos (por ejemplo, hialuronano) o proteoglicanos, u otras adhesinas). Las funciones estructurales útiles retenidas por ATM incluyen mantenimiento de la arquitectura histológica, mantenimiento de la red tridimensional de los componentes de tejido y características físicas tales como resistencia, elasticidad, y durabilidad, porosidad definida, y retención de macromoléculas. La eficiencia de las funciones biológicas de una ATM puede medirse, por ejemplo, por la capacidad de la ATM para soportar la proliferación de células (por ejemplo, células epiteliales) y es al menos 30% (por ejemplo, al menos: 40%; 50%; 60%; 70%; 80%; 90%; 95%; 98%; 99%; 99,5%; 100%; o más de 100%) de la correspondiente al tejido u órgano nativo a partir del cual se produce la ATM. No es necesario que la ATM esté hecha de tejido que sea idéntico al tejido hospedador circundante, sino que debería simplemente ser susceptible de remodelación por las células invasoras o infiltrantes tales como células diferenciadas del tejido hospedador relevante, citoblastos tales como citoblastos del tallo mesenquimático, o células progenitoras. De acuerdo con la presente invención, la ATM se produce a partir de la dermis.

Una ATM útil para la invención puede estar hecha opcionalmente de un tejido basado en colágeno del propio receptor. Adicionalmente, si bien una ATM se habrá producido por lo general a partir de uno o más sujetos de la misma especie que el receptor de la composición de reparación de tejidos, este no es necesariamente el caso. Así, por ejemplo, una ATM puede haberse producido a partir de un tejido de porcino y utilizarse para producir una composición de reparación de tejidos que puede implantarse en un paciente humano. Las especies que pueden servir como receptores de una composición de reparación de tejidos y donantes de tejidos u órganos para la producción del componente ATM de la composición de reparación de tejidos pueden incluir, sin limitación, mamíferos, tales como humanos, primates no humanos (por ejemplo, monos, babuinos, o chimpancés), cerdos, vacas, caballos, cabras, ovejas, perros, gatos, conejos, cobayos, jerbos, hámsteres, ratas, o ratones. Además, pueden utilizarse razas diferentes de animales de una misma especie (por ejemplo, lechones de Yucatán o cerdos Yorkshire).

De particular interés como donantes son animales (por ejemplo, cerdos y vacas) que se han diseñado genéticamente para carecer del resto terminal galactosa- α -1,3-galactosa. Para descripciones de animales apropiados, véanse la solicitud estadounidense publicada N.º 2005/0028228 A1 y la patente de Estados Unidos N.º 6.166.288, también en tramitación con la presente. Un problema importante de xenotrasplante en animales receptores (por ejemplo, humanos) que no expresan la enzima UDP-galactosa: β -D-galactosil-1,4-N-acetil-D-glucosaminida- α -1,3-galactosil-transferasa (α -1,3-galactosil-transferasa; " α -GT") que cataliza la formación de la estructura del disacárido terminal, galactosa α -1,3-galactosa (" α -gal"), es el rechazo hiperagudo de xenoinjertos en tales receptores. Este rechazo es en gran parte, si no exclusivamente, debido a la acción de anticuerpos específicos para el epítipo α -gal en la superficie de las células del xenoinjerto. Se han obtenido animales transgénicos no humanos (por ejemplo, cerdos y vacas) que carecen, o carecen sustancialmente, de α -GT funcional y por tanto carecen, o carecen sustancialmente también, de epítipos α -gal.

Los métodos de producción de animales transgénicos no humanos y, en particular animales transgénicos sometidos a alteración génica, son bien conocidos en la técnica. Los métodos de producción de animales no humanos sometidos a alteración génica implican, por ejemplo, incorporación de una forma que ha sufrido alteración de un gen de interés en la línea germinal de un sujeto de una especie no humana. El gen puede sufrir alteración génica de tal modo que no fabrique cantidad alguna de un producto proteínico (por ejemplo, α -GT) o fabrique un producto proteínico que carezca de la actividad, o carezca sustancialmente de la actividad de la proteína nativa. Como se utiliza en esta memoria, una proteína α -GT "que carece sustancialmente de actividad de α -GT" es una proteína α -GT que tiene menos de 5% (por ejemplo, menos de: 4%; 2%; 1%; 0,1%; 0,01%; 0,001%; o incluso menos de 0,001%) de la capacidad de la α -GT de tipo natural para generar epítipos α -gal. Los métodos de alteración de genes y, en particular, el gen α -GT, se conocen en la técnica e implican generalmente el proceso conocido como recombinación homóloga. En este proceso, una o ambas copias de un gen de tipo natural de interés pueden alterarse por inserción de una secuencia en el gen o genes de tipo natural tal que no se produce transcrito alguno del gen o genes; o se produce un transcrito a partir del cual no se traduce proteína alguna; o se produce un transcrito que dirige la síntesis de una proteína que carece, o carece sustancialmente, de la actividad funcional de la proteína de interés. Tales construcciones incluyen típicamente la totalidad o parte de la secuencia genómica del gen de interés y contienen, dentro de dicha estructura genómica, una secuencia que alterará la expresión del gen de interés de una de las maneras descritas anteriormente. La secuencia utilizada para alterar la expresión del gen puede ser una secuencia que codifica una proteína que confiere resistencia a antibióticos (por ejemplo, resistencia a neomicina) en células diana que han incorporado la construcción a sus genomas. Una secuencia codificante de este tipo facilita la selección *in vitro* de células que han incorporado la

construcción genética a sus genomas. Metodologías adicionales de selección de fármacos conocidas en la técnica pueden utilizarse para seleccionar células en las que se ha producido recombinación entre la construcción y al menos una copia del gen diana.

5 En algunos métodos de generación de animales no humanos sometidos a alteración génica, pueden utilizarse como células diana células humanas totipotentes (es decir, células capaces de dar lugar a todos los tipos de células de un embrión). Tales células incluyen, por ejemplo citoblastos embrionarios (ES) (en la forma de linajes de células ES) u óvulos fertilizados (oocitos). Una población de células ES en la cual al menos una copia del gen de interés ha sufrido alteración puede inyectarse en blastocistos no humanos apropiados y los blastocistos inyectados pueden implantarse en madres adoptivas no humanas. Alternativamente, los óvulos no humanos fertilizados inyectados con la construcción de alteración génica de interés pueden implantarse en las madres adoptivas no humanas. Además, los oocitos no humanos implantados en madres adoptivas no humanas pueden ser los que se han enucleados y recibido una inyección con núcleos de células ES alteradas génicamente con éxito [Campbell et al. (1996) Nature 380: 64-66]. La descendencia resultante que contiene la mutación procedente de tales madres adoptivas no humanas puede identificarse y, a partir de estos animales fundadores, pueden producirse linajes animales distintos utilizando métodos de reproducción y selección conocidos por los expertos en la técnica.

Pueden producirse también animales transgénicos no humanos estándar y que han sufrido alteración génica utilizando células somáticas (por ejemplo, fibroblastos fetales) como células diana para la alteración génica. Tales células crecen mucho más rápidamente y se manipulan con facilidad mucho mayor *in vitro* que, por ejemplo, las células ES, facilitando con ello los procedimientos de alteración génica y selección celular subsiguiente de genes que han sufrido alteración. Una vez que se ha seleccionado *in vitro* un linaje de células somáticas con genes que han sufrido alteración, los núcleos procedentes de las células somáticas de genes que han sufrido alteración pueden incorporarse a células totipotentes no humanas (por ejemplo, células ES u oocitos), que se manipulan luego como se ha descrito arriba. Los métodos para trasplante nuclear son conocidos por los expertos en la técnica e incluyen técnicas tales como, por ejemplo, fusión celular o trasplante nuclear.

Muy comúnmente, los procedimientos de alteración génica dan como resultado la alteración de un solo alelo de un gen de interés. En estos casos, los animales transgénicos no humanos serán heterocigóticos para el gen alterado. La reproducción de tales heterocigotos y los procedimientos de selección apropiados familiares para los especialistas en la técnica pueden utilizarse luego para derivar animales no humanos que son homocigóticos para el gen alterado. Naturalmente, tales procedimientos de reproducción no son necesarios cuando el procedimiento de alteración génica arriba descrito haya dado como resultado la alteración de ambos alelos del gen de interés.

35 Como alternativa al uso de animales diseñados genéticamente, pueden utilizarse tratamientos enzimáticos específicos para eliminación de la galactosa- α -1,3-galactosa terminal. El tratamiento enzimático de ATM con una α -1,3-galactosidasa puede realizarse utilizando una glicosidasa específica que tenga actividad α -1,3-galactosidasa, por ejemplo, α -1,3-galactosidasa de los granos de café. Esta enzima puede derivarse de fuentes naturales o producirse utilizando el sistema de expresión de *Pichia pastoris* o cualquier otro sistema recombinante capaz de producir una α -1,3-galactosidasa funcional.

Para la producción de una composición de reparación de tejidos, se utiliza generalmente ATM en la forma de fragmentos (es decir, partículas, hebras o fibras) (véase más adelante). La ATM puede producirse por cualquiera de una diversidad de métodos. Todo lo que se requiere es que las etapas utilizadas en su producción den como resultado matrices con las propiedades biológicas y estructurales anteriormente descritas. Los métodos particularmente útiles de producción incluyen los descritos en las patentes de Estados Unidos Núms. 4.865.871; 5.366.616; 6.933.326 y las solicitudes estadounidenses publicadas Núms. 2003/0035843 A1, y 2005/0028228 A1, también en tramitación con la presente.

50 Resumidamente, los pasos implicados en la producción de una ATM incluyen generalmente recoger el tejido de un donante (por ejemplo, un cadáver humano o cualquiera de los mamíferos enumerados anteriormente), tratamiento químico a fin de estabilizar el tejido y evitar la degradación bioquímica y estructural junto con, o seguido por, separación de las células en condiciones que preservan análogamente la función biológica y estructural. La ATM puede tratarse opcionalmente con un agente de criopreservación y criopreservarse y, opcionalmente, liofilizarse, una vez más, en las condiciones necesarias para mantener las propiedades biológicas y estructurales descritas de la matriz. Después de congelación o liofilización, el tejido puede fragmentarse, por ejemplo, pulverizarse o micronizarse para producir una ATM particulada en condiciones similares de preservación de funciones. Todos los pasos se llevan a cabo generalmente en condiciones asépticas, preferiblemente estériles.

60 A continuación se resume un método ilustrativo de producción de ATM, que se describe con mayor detalle en la patente de Estados Unidos N.º 5.366.616.

Después de la extracción del donante, el tejido se dispone en una solución estabilizadora inicial. La solución estabilizadora inicial detiene y previene la degradación osmótica, hipóxica, autolítica, y proteolítica, protege contra la contaminación microbiana, y reduce el deterioro mecánico que puede ocurrir con tejidos que contienen, por ejemplo, componentes de musculatura lisa (por ejemplo, vasos sanguíneos). La solución estabilizadora contiene generalmente

un tampón apropiado, uno o más antioxidantes, uno o más agentes oncóticos, uno o más antibióticos, uno o más inhibidores de proteasas, y en algunos casos, un relajante de la musculatura lisa.

El tejido se dispone luego en una solución de procesamiento para separar las células viables (por ejemplo, células epiteliales, células endoteliales, células de musculatura lisa, y fibroblastos) de la matriz estructural sin deteriorar el complejo de la membrana base o la integridad biológica y estructural de la matriz de colágeno. La solución de proceso contiene generalmente un tampón apropiado, sal, un antibiótico, o uno o más detergentes, uno o más agentes para prevenir la reticulación, uno o más inhibidores de proteasas, y/o una o más enzimas.

Un tampón apropiado puede ser un tampón orgánico, por ejemplo ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MPOS) y ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N¹-2-etano-sulfónico (HEPES). Alternativamente, un tampón bajo en sal o fisiológico, con inclusión de fosfato, bicarbonato y acetato-citrato, puede ser más apropiado en ciertas aplicaciones. Las sales pueden incluir sales fisiológicas comunes tales como cloruro de sodio o cloruro de potasio. Los antibióticos pueden incluir, por ejemplo, penicilina, estreptomycin, gentamicina, kanamicina, neomicina, bacitracina, y vancomicina. Adicionalmente, pueden emplearse agentes antifúngicos, que incluyen anfotericina-B, nistatina, y polimixina. Los detergentes adecuados incluyen, sin limitación, por ejemplo, desoxicolato de sodio, Triton-X-100™ (Rohm & Haas, Filadelfia, PA); monooleato de polioxietilen-(20)-sorbitán (Tween 20); monooleato de polioxietilen-(80)-sorbitán (Tween 80); 3-[(3-cloramidopropil)-dimetilamino]-1-propano-sulfonato; octil-glucosido; y dodecil-sulfato de sodio. Los agentes que inhiben o previenen la formación de reticulaciones pueden incluir ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido ascórbico y otros agentes de barrido de radicales libres. Los ejemplos de inhibidores de proteasas útiles incluyen, sin limitación, N-etilmaleimida (NEM), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), ácido etilenglicol-bis (2-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA), leupeptina, cloruro de amonio, aumento del pH, y aprotinina. Los ejemplos de enzimas útiles incluyen, sin limitación, tripsina, y termolisina. En algunas realizaciones, puede incluirse en la solución de procesamiento un agente de equilibrio osmótico para proporcionar un equilibrio osmótico coloidal entre la solución y el tejido, previniendo así la difusión de proteoglicanos endógenos del tejido a la solución. El agente de equilibrio osmótico puede ser, por ejemplo, sin limitación, un proteoglicano, por ejemplo, sulfato de condroitina, sulfato de heparina, o sulfato de dermatano, o un polímero, por ejemplo, dextrano o polivinilpirrolidona (PVP), o un aminoácido, por ejemplo, glicina o valina.

El tratamiento del tejido tiene que realizarse con una solución de procesamiento que contenga principios activos en una concentración y durante un periodo de tiempo tales que, después del procesamiento, el tejido retenga los atributos biológicos y estructurales del tejido nativo no procesado (véase la descripción anterior de ATM).

Después de la eliminación de las células, el tejido puede congelarse (es decir, criopreservarse) y opcionalmente, liofilizarse. Antes de la congelación, el tejido puede incubarse en una solución de criopreservación. Esta solución contiene generalmente uno o más crioprotectores a fin de minimizar el deterioro por los cristales de hielo de la matriz estructural que podría ocurrir durante la congelación. Los ejemplos de crioprotectores útiles se proporcionan en la patente de Estados Unidos N.º 5.336.616. Si el tejido debe liofilizarse, la solución contendrá también generalmente uno o más componentes de protección en seco, a fin de minimizar el deterioro estructural durante el secado, y puede incluir una combinación de un disolvente orgánico y agua que no experimente expansión ni contracción durante la congelación. Los agentes crioprotectores y protectores en seco pueden ser las mismas una o más sustancias. Si el tejido no se va a liofilizar, se puede congelar poniéndolo (en un recipiente esterilizado) en un congelador a aproximadamente -80°C, o por inmersión del mismo en nitrógeno líquido estéril, seguido por almacenamiento a una temperatura inferior a -160°C hasta su utilización. La muestra puede descongelarse antes de su uso mediante, por ejemplo, inmersión de una vasija estéril no permeable (véase más adelante) que contiene la muestra en un baño de agua a aproximadamente 37°C o dejando que el tejido vuelva a la temperatura ambiente en condiciones ambientales.

Si el tejido debe congelarse y liofilizarse, después de incubación en la solución de criopreservación, el tejido puede envasarse en el interior de una vasija estéril que es permeable al vapor de agua pero impermeable a las bacterias, por ejemplo, una bolsa permeable al vapor de agua o un vial de vidrio. Un lado de una bolsa preferida está constituido por una membrana porosa de grado médico Tyvek®, un producto comercializado de DuPont Company de Wilmington, DE. Esta membrana es porosa al vapor de agua e impermeable a las bacterias y el polvo. La membrana Tyvek® se sella térmicamente a una lámina impermeable estratificada de polietileno, dejando un lado abierto, formando de este modo una bolsa de dos lados. La bolsa abierta se esteriliza por irradiación (por ejemplo, irradiación γ) y antes de su utilización. El tejido se coloca asépticamente (por el lado abierto) en la bolsa estéril. El lado abierto se sella luego térmicamente en condiciones asépticas para cerrar la bolsa. El tejido envasado se protege posteriormente contra la contaminación microbiana mediante etapas de procesamiento posteriores.

La vasija que contiene el tejido se enfría a baja temperatura a un régimen especificado que sea compatible con la formulación crioprotectora específica a fin de minimizar el deterioro por la congelación. Véase la patente de Estados Unidos N.º 5.336.616 para ejemplos de protocolos de enfriamiento apropiados. El tejido se seca luego a baja temperatura en condiciones de vacío, de tal modo que el vapor de agua se elimina secuencialmente de cada fase de cristales de hielo.

Una vez completado el secado de las muestras en la vasija permeable al vapor de agua, el vacío del aparato de liofilización se revierte con un gas inerte seco tal como nitrógeno, helio o argón. Mientras se mantiene en el mismo ambiente gaseoso, la vasija semipermeable se coloca en el interior de una vasija impermeable (es decir, impermeable al vapor de agua así como a los microorganismos) (por ejemplo, una bolsa) que se sella ulteriormente, por ejemplo, por calor y/o presión. En el caso de una muestra de tejido que se ha congelado y secado en un vial de vidrio, el vial se sella a vacío con un tapón inerte apropiado y el vacío del aparato de secado se revierte con un gas inerte antes de la descarga. En cualquier caso, el producto final se sella herméticamente en una atmósfera gaseosa inerte. El tejido liofilizado puede guardarse en condiciones refrigeradas hasta su fragmentación o, si se desea, rehidratación.

Los fragmentos de ATM son partículas (material particulado), fibras, o hebras.

La ATM particulada tiene una forma generalmente esférica o incluso irregular, siendo la dimensión máxima no mayor que 1000 micrómetros. Una ATM particulada puede producirse a partir de cualquiera de las ATM no particuladas descritas anteriormente por cualquier proceso que dé como resultado la preservación de las funciones biológicas y estructurales anteriormente descritas y, en particular, debería minimizar el deterioro de las fibras de colágeno, con inclusión de extremos de fibra cizallados.

Un método apropiado para producir ATM particulada se describe en la patente de Estados Unidos N.º 6.933.326. El proceso se describe brevemente a continuación con respecto a una ATM dérmica liofilizada (matriz dérmica acelular; ADM).

La ADM puede cortarse en tiras (utilizando, por ejemplo, un reticulador Zimmer provisto de una rueda cortante "continua" ininterrumpible). Las tiras largas resultantes se cortan seguidamente a longitudes de aproximadamente 1 cm a aproximadamente 2 cm. Un homogeneizador y una sonda homogeneizadora esterilizada (por ejemplo, un homogeneizador Lab-Teck Macro disponible de OMNI International, Warrenton, VA) se ensambla y se enfría a temperaturas criogénicas (a saber, aproximadamente -196°C hasta aproximadamente -160°C) utilizando nitrógeno líquido estéril que se vierte en la torre del homogeneizador. Una vez que el homogeneizador ha alcanzado una temperatura criogénica, se añaden trozos de ADM cortados a la torre de homogeneización que contiene el nitrógeno líquido. El homogeneizador se activa luego a fin de fracturar criogénicamente las piezas de ADM. El tiempo y la duración de la etapa de fracturación criogénica dependen del homogeneizador utilizado, el tamaño de la cámara de homogeneización, y la velocidad y el tiempo en que se hace funcionar el homogeneizador, y son fácilmente determinables por una persona con experiencia en la técnica. Como alternativa, el proceso de crio fracturación puede realizarse en un criomolino enfriado a una temperatura criogénica.

La ATM crio fracturada particulada se clasifica, opcionalmente por tamaños de partícula, mediante lavado del producto de la homogeneización con nitrógeno líquido estéril por medio de una serie de tamices metálicos que se han enfriado también a una temperatura criogénica. Generalmente es útil eliminar las partículas grandes indeseables con un tamiz que tenga un tamaño de poro relativamente grande antes de pasar a uno (o más) tamices con un tamaño de poro más pequeño. Una vez aisladas, las partículas pueden liofilizarse para asegurar que cualquier humedad residual que pueda haberse absorbido durante el fraccionamiento se elimine. El producto final es un polvo (usualmente blanco o blanquecino) que tiene generalmente un tamaño de partícula de aproximadamente 1 micrómetro a aproximadamente 900 micrómetros, aproximadamente 30 micrómetros a aproximadamente 750 micrómetros, o aproximadamente 150 a aproximadamente 300 micrómetros.

Los fragmentos de ATM pueden ser también fibras o hebras. Tales fibras o hebras no deberían ser generalmente mayores que 5 cm (por ejemplo, no mayores de: 4,5 cm; 4,0 cm; 3,5 cm; 3,0 cm; 2,5 cm; 2,0 cm; 1,5 cm; 1,0 cm; 0,5 cm; 0,25 cm; 0,1 cm; 0,05 cm; o 0,02 cm) de longitud y no mayores que 3 mm (por ejemplo, no mayores de: 2,5 mm; 2,0 mm; 1,5 mm; 1,0 mm; 0,5 mm; 0,2 mm; 0,1 mm; 0,05 mm; 0,02 mm; o 0,01 mm) en su punto más ancho. Los métodos de producción de fibras y hebras a partir de ATM congelada o liofilizada serán evidentes para las personas expertas en la técnica e incluyen corte tanto manual como mecánico de la ATM congelada o liofilizada.

Una ATM liofilizada muy adecuada se produce a partir de dermis humana por LifeCell Corporation (Branchburg, NJ) y se comercializa en forma de pequeñas láminas como AlloDerm®. LifeCell Corporation comercializa tales láminas como láminas rectangulares con dimensiones de, por ejemplo, 1 cm x 2 cm, 3 cm x 7 cm, 4 cm x 8 cm, 5 cm x 10 cm, 4 cm x 12 cm, y 6 cm x 12 cm. El crioprotector utilizado para congelar y secar AlloDerm® es una solución de maltodextrina al 35% y etilendiaminotetraacetato (EDTA) 10 mM. Así, el producto secado final contiene aproximadamente 60% en peso de ATM y aproximadamente 40% en peso de maltodextrina. LifeCell Corporation produce también un producto análogo a partir de dermis de porcino (designado XenoDerm™) que tiene las mismas proporciones de ATM y maltodextrina que AlloDerm®. Adicionalmente, LifeCell Corporation comercializa una matriz dérmica acelular particulada producida por crio fracturación de AlloDerm® (como se ha descrito arriba) bajo el nombre Cymetra®. El tamaño de partícula de Cymetra® está comprendido en el intervalo de aproximadamente 60 micrómetros a aproximadamente 150 micrómetros como se determina por masa. Las partículas de ATM particulada o pulverizada (en polvo) serán menores que 1,0 mm en su dimensión mayor. Los trozos de ATM con dispersiones mayores que estas son matrices acelulares no particuladas.

Sustratos de malla

De acuerdo con la invención, la composición biocompatible para reparación de tejidos puede incluir un sustrato de malla.

Puede utilizarse cualquier sustrato de malla biocompatible sintético, por ejemplo, una malla quirúrgica. Los sustratos de malla quirúrgica son materiales tejidos multifilamento que están disponibles en muchas formas y se han producido a partir de una diversidad de materiales sintéticos y naturales. Las mallas pueden clasificarse ampliamente conforme a la estructura del filamento, el tamaño de poro y el peso. La estructura de los filamentos puede ser de fibras monofilamento, multifilamento o multifilamento formadas a partir de materiales monofilamento. Los tamaños de poro pueden estar comprendidos de aproximadamente 200 μ a aproximadamente 5000. Los tamaños de poro pequeños, por ejemplo, 1000 μ o menores, son típicos de mallas de peso elevado, mientras que los tamaños de poro más pequeños, por ejemplo, mayores que 1000 μ son característicos de mallas ligeras. El peso de malla se expresa como g/m^2 , teniendo las mallas pesadas densidades de aproximadamente 80-100 g/m^2 , en tanto que las mallas ligeras tienen densidades en el intervalo de 25-45 g/m^2 .

El sustrato de malla puede estar hecho de un material no absorbible, un material absorbible o un material que sea una combinación de materiales no absorbibles y absorbibles. "Material absorbible" se define en esta memoria como cualquier material que puede degradarse en el cuerpo de un receptor mamífero por procesos enzimáticos o celulares endógenos. Dependiendo de la composición particular del material, los productos de degradación pueden reciclarse por caminos metabólicos normales o excretarse por uno más sistemas orgánicos. Naturalmente, un "material no absorbible" es uno que no puede ser degradado en el cuerpo de un receptor mamífero por procesos enzimáticos o celulares endógenos.

Los polímeros utilizados para producir mallas no absorbibles incluyen polipropileno, poliéster, a saber, poli(tereftalato de etileno), o politetrafluoretileno (PTFE). Los ejemplos de mallas de propileno disponibles comercialmente incluyen polipropileno/PTFE: Marlex™ (CR Bard, Inc., Cranston RI), Visilex® (CR Bard, Inc., Cranston RI), PerFix® Plug (CR Bard, Inc., Cranston RI), Kugel™ Hernia Patch (CR Bard, Inc., Cranston RI), 3DMax® (CR Bard, Inc., Cranston RI), Prolene™ (Ethicon, Inc., Somerville, NJ), Surgipro™ (Autosuture, U.S.Surgical, Norwalk, CT), Prolite™ (Atrium Medical Co., Hudson, NH), Prolite Ultra™ (Atrium Medical Co., Hudson, NH), Trelex™ (Meadox Medical, Oakland, NJ), y Parietene® (Sofradim, Trévoux, Francia). Los ejemplos de mallas poliéster disponibles comercialmente incluyen Mersilene™ (Ethicon, Inc., Somerville, NJ) y Parietex® (Sofradim, Trévoux, Francia). Los ejemplos de mallas de PTFE disponibles comercialmente incluyen Goretex® (W.L.Gore & Associates, Newark, DE), Dualmesh® (W.L.Gore & Associates, Newark, DE), Dualmesh® Plus (W.L.Gore & Associates, Newark, DE), Dulex® (CR Bard, Inc., Cranston RI), y Reconix® (CR Bard, Inc., Cranston RI).

Las mallas absorbibles están disponibles también de fuentes comerciales. Los polímeros de utilidad para producir mallas absorbibles pueden incluir ácido poliglicólico (Dexon™, Syneture™, U.S.Surgical, Norwalk, CT), ácido poli-1-láctico, poliglactina 910 (Vicryl™, Ethicon, Somerville, N.J.), o derivados de polihidroxialcanoato tales como poli-4-hidroxibutirato (Tepha, Cambridge, MA).

Las mallas compuestas, es decir, mallas que incluyen a la vez materiales absorbibles y no absorbibles pueden producirse a partir de combinaciones de los materiales anteriormente descritos o de materiales adicionales. Los ejemplos de mallas compuestas disponibles comercialmente incluyen polipropileno/PTFE: Composix® (CR Bard, Inc., Cranston RI), Composix® E/X (CR Bard, Inc., Cranston RI), y Ventralex® (CR Bard, Inc., Cranston RI); polipropileno/celulosa: Proceed™ (Ethicon, Inc., Somerville, NJ); polipropileno/Septrafilm®: Sepramesh® (Genzyme, Cambridge, MA), Sepramesh® IP (Genzyme, Cambridge, MA); polipropileno/Vicryl: Vypro™ (Ethicon, Somerville, N.J.), Vypro™ II (Ethicon, Somerville, N.J.); polipropileno/Monocryl(poliglecaprona): Ultrapro® (Ethicon, Somerville, N.J.); y poliéster/colágeno: Parietex® Composite (Sofradim, Trévoux, Francia).

II. Preparación de la composición de reparación de tejidos

La composición biocompatible de reparación de tejidos proporcionada en esta memoria se produce por hinchamiento de fragmentos de ATM en una solución ácida para crear una suspensión homogénea de partículas hinchadas de ATM, y la suspensión se seca para producir un película de colágeno o estructura semejante a una esponja. Típicamente, el volumen ocupado por los fragmentos de ATM hinchados es mayor con relación al volumen ocupado por la misma masa de fragmentos de ATM que no se han hinchados. En algunas realizaciones, el hinchamiento puede realizarse a temperaturas moderadamente elevadas. La ATM puede encontrarse en la forma de fragmentos, es decir, partículas, fibras o hebras. Antes del hinchamiento, la ATM puede lavarse para eliminar cualquier crioprotector residual. Las soluciones utilizadas para lavado pueden ser cualquier solución fisiológicamente compatible; soluciones de lavado muy adecuadas son, por ejemplo, agua desionizada o destilada, o solución salina tamponada con fosfato (PBS).

La ATM puede hincharse en cualquier solución ácida que mantenga los fragmentos de ATM como una suspensión homogénea, y no dé como resultado una desnaturalización sustancial irreversible de las fibras de colágeno en la ATM. Como se define en esta memoria, una suspensión homogénea de partículas de ATM es una en la cual las partículas de ATM están distribuidas uniformemente en un medio líquido y no contiene partículas que sean mayores que aproximadamente 1000 μ de tamaño, por ejemplo, mayores que aproximadamente 950 μ , aproximadamente 975 μ , aproximadamente 1000 μ , aproximadamente 1025 μ , aproximadamente 1050 μ , aproximadamente 1075 μ , aproximadamente 1100 μ o mayores. Como se utiliza en esta memoria, "desnaturalización sustancial irreversible" se

refiere en general a la disociación de las fibrillas de colágeno en sus subfibrillas y/o moléculas de colágeno constituyentes, tales que las subfibrillas y/o moléculas de colágeno sean sustancialmente incapaces de replegarse y volver a ensamblarse en fibrillas de colágeno nativas. Como se utiliza en esta memoria, en las subfibrillas y/o moléculas de colágeno que son "sustancialmente incapaces de replegarse y volver a ensamblarse en fibrillas de colágeno nativas", no más de 30% (por ejemplo, no más de: 25%; 20%; 15%; 10%; 5%; 2%; 1%; 0,1%; 0,01%; o menos) de las subfibrillas y/o moléculas de colágeno son capaces de replegarse y volver a ensamblarse en fibrillas de colágeno nativas. La fibrilla de colágeno nativa es un haz de muchas subfibrillas, cada una de las cuales es a su vez un haz de microfibrillas. Una microfibrilla consiste en moléculas de colágeno enrolladas helicoidalmente, cada una de las cuales consiste en tres cadenas de polipéptido helicoidales. Esta disposición de las moléculas de colágeno en las fibrillas de colágeno da como resultado una periodicidad de formación de bandas características de 64-67 nm. Típicamente, las fibrillas de colágeno desnaturalizadas irreversiblemente carecen, o carecen sustancialmente, de la periodicidad de formación de bandas encontrada en la fibrilla de colágeno nativa. La desnaturalización irreversible sustancial de las fibrillas de colágeno puede monitorizarse por cualquier método conocido por los expertos en la técnica incluyendo, por ejemplo, pero sin limitación, microscopía electrónica de transmisión, microscopía electrónica de barrido, y microscopía de fuerza atómica, o por métodos bioquímicos o enzimáticos, por ejemplo, electroforesis en gel de poliacrilamida o susceptibilidad de escisión enzimática por colagenasa, pepsina o proteinasa K. Así, la ATM puede hincharse en cualquier solución ácida que no dé como resultado una pérdida sustancial de la periodicidad de formación de bandas.

Se apreciará que el tipo de ácido, la concentración del ácido, la duración del tiempo de hinchamiento, y la temperatura de hinchamiento pueden ajustarse para conseguir el hinchamiento óptimo de la ATM. Por ejemplo, ATM de fuentes diferentes, por ejemplo, especies diferentes de mamífero o variedades o razas diferentes de la misma especie, pueden requerir condiciones diferentes de hinchamiento a fin de conseguir un hinchamiento óptimo sin desnaturalización irreversible sustancial de las fibrillas de colágeno en la ATM.

Un ácido es una molécula de actúa como donante de protones y por tanto aumenta la concentración de H^+ de una solución. Los ácidos que ceden fácilmente protones al agua son ácidos fuertes, mientras que los que tienen solo una ligera tendencia a ceder protones son ácidos débiles. Un índice útil de la concentración de iones H^+ en una solución es la escala de pH; una solución acuosa con un pH menor que 7 se considera ácida. De acuerdo con la invención, los fragmentos de ATM pueden hincharse en cualquier solución acuosa que tenga un pH inferior a 3,0, por ejemplo, 2,8, 2,6, 2,4, 2,2, 2,0, 1,8, 1,6, 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,0 e inferior. "Aproximadamente" indica que el pH puede variar en hasta 0,2 unidades de pH por encima o por debajo del valor indicado. Los ejemplos de ácidos útiles incluyen ácido acético, ácido ascórbico, ácido bórico, ácido carbónico, ácido cítrico, ácido clorhídrico, ácido láctico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido tánico y ácido tricloroacético. Puede utilizarse también cualquier combinación de dos o más ácidos.

La concentración específica de ácido dependerá en parte de la fuerza relativa del ácido, requiriendo los ácidos más fuertes, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, menores concentraciones, y requiriendo los ácidos más débiles, por ejemplo, ácido acético, ácido cítrico, y ácido láctico concentraciones mayores. Así, la concentración y el límite inferior del de pH para la incubación variarán de un ácido a otro. En algunas realizaciones, el ácido es un ácido volátil, es decir, un ácido que se evapora fácilmente a las temperaturas y presiones normales. Las concentraciones y los valores de pH apropiados son los que no dan como resultado una desnaturalización irreversible sustancial de las fibras de colágeno de la ATM (véase anteriormente).

Un ácido muy adecuado es el ácido acético. El ácido acético puede utilizarse a concentraciones comprendidas en el intervalo entre aproximadamente 25 mM y aproximadamente 250 mM, por ejemplo, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, o 600 mM. Otro ácido adecuado es ácido clorhídrico (HCl). El HCl puede utilizarse a concentraciones comprendidas en el intervalo entre aproximadamente 25 mM y aproximadamente 200 mM, por ejemplo, 25, 40, 50, 60, 80, 100, 175, y 200 mM. "Aproximadamente" indica que la concentración del ácido puede variar hasta un 10% por encima o por debajo del valor indicado. Así, por ejemplo, una concentración de ácido acético de "aproximadamente" 50 mM puede incluir, por ejemplo, 45 mM, 46 mM, 47 mM, 48 mM, 49 mM, 50 mM, 51 mM, 52 mM, 53 mM, 54 mM, o 55 mM.

La ATM puede hincharse en ácido durante cualquier periodo de tiempo requerido para producir una suspensión homogénea de fragmentos de ATM. La ATM puede hincharse, por ejemplo durante aproximadamente 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, 10,0, 11,0, 12,0, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 horas o más. "Aproximadamente" indica que el tiempo de hinchamiento puede variar en hasta 0,2 horas por encima o por debajo del valor indicado. Así, un tiempo de hinchamiento de "aproximadamente" 3 horas puede incluir, por ejemplo, 2,8 horas, 2,85 horas, 2,90 horas, 2,95 horas, 3,0 horas, 3,05 horas, 3,10 horas, 3,15 horas, o 3,20 horas.

La concentración final de ATM en la solución ácida puede ser cualquier concentración que se hinche uniformemente y que dé como resultado una suspensión homogénea de fragmentos de ATM. Las propiedades de hinchamiento pueden variar conforme a la procedencia del tejido del que se derivó la ATM; en general, las concentraciones útiles (p/v) para la ATM derivada de porcino pueden variar de aproximadamente 0,1% por ejemplo, 0,08%, 0,085%, 0,09%, 0,1%, 0,15% hasta aproximadamente 4%, por ejemplo, aproximadamente 3,8%, 3,85%, 3,9%, 4,0%, 4,05%, 4,1%, 4,15%, o 4,2%. Una concentración adecuada para la ATM derivada de porcino es 0,5%. La extensión del aumento en volumen de los fragmentos de ATM puede medirse recogiendo los fragmentos de ATM por centrifugación y determinando el volumen ocupado por los sedimentos antes y después del periodo de hinchamiento (véase Ejemplo

1). El cambio de volumen puede ser en veces, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces o más con relación a la ATM antes del hinchamiento con ácido. La extensión del hinchamiento variará de una ATM a otra, y de una especie a otra. Por regla general, pero no necesariamente, se utilizan condiciones de hinchamiento que dan como resultado un hinchamiento máximo de la ATM. Después del hinchamiento, los fragmentos de ATM ocuparán un volumen al menos 1,2 veces mayor que el ocupado antes del hinchamiento. Por ejemplo, los fragmentos pueden ocupar un volumen que es 1,2 veces, 1,5 veces, 1,8 veces, 2,0 veces, 3,0 veces, 4,0 veces, 5,0 veces, 6,0 veces, 7,0 veces, 8,0 veces, 9,0 veces, 10,0 veces, 11,0 veces, 12,0 o más veces mayor que el volumen ocupado antes del hinchamiento. Puede utilizarse cualquier método conocido en la técnica para ensayar la extensión del hinchamiento, con inclusión, por ejemplo, sin limitación, de la medida directa del volumen ocupado por la ATM, o medidas indirectas tales como cambios en densidad, viscosidad o dispersión de la luz de la solución de ATM.

La suspensión homogénea de los fragmentos de ATM puede someterse a temperaturas moderadamente elevadas con relación a la temperatura ambiente. Como se define en esta memoria, la temperatura ambiente es de aproximadamente 23°C hasta aproximadamente 27°C, por ejemplo, 23°C, 24°C, 25°C, 26°C o 27°C. Como se define en esta memoria, "temperaturas moderadamente elevadas" incluyen temperaturas que van de aproximadamente 28°C hasta aproximadamente 42°C, por ejemplo, 28 °C, 29 °C, 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C, 37 °C, 38 °C, 39 °C, 40 °C, 41°C, o 42 °C. La ATM puede someterse a temperaturas moderadamente elevadas antes de la etapa de hinchamiento en ácido, simultáneamente al paso de hinchamiento en ácido, o después de la etapa de hinchamiento en ácido. "Aproximadamente" indica que la temperatura puede variar en hasta 2°C por encima o por debajo del valor citado. Así, una temperatura de "aproximadamente" 30°C puede incluir, por ejemplo, 28,0 °C, 28,5 °C, 29,0 °C, 2,95 °C, 30,0 °C, 30,5 °C, 31,0 °C, 31,5 °C, o 32,0 °C. La suspensión homogénea de los fragmentos de ATM puede someterse a una temperatura moderadamente elevada durante, por ejemplo, aproximadamente 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 7,0, 9,0, 10,0, 11,0, 12,0, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 o más horas. "Aproximadamente" indica que el tiempo de hinchamiento puede variar en hasta 0,2 horas por encima o por debajo del valor indicado. Así, un tiempo de hinchamiento de "aproximadamente" 3 horas puede incluir, por ejemplo, 2,8 horas, 2,85 horas, 2,90 horas, 2,95 horas, 3,0 horas, 3,05 horas, 3,10 horas, 3,15 horas, o 3,20 horas.

Una vez que la ATM se ha hinchado en ácido y se ha sometido a temperaturas elevadas, se usa para formar una composición de película dérmica biocompatible. Para formar la composición de malla biocompatible, la solución homogénea de ATM puede aplicarse a una malla biocompatible de tal modo que la malla tejida se impregne con la solución. Pueden utilizarse cualesquiera métodos para recubrimiento de materiales de malla que retengan las propiedades biocompatibles de la malla recubierta. Por ejemplo, la ATM hinchada puede verterse o extrudirse en un recipiente y los materiales de malla añadirse a y/o integrarse en la suspensión de ATM. Alternativa o adicionalmente, la ATM hinchada puede depositarse sobre la malla por aerosolización, pulverización, centrifugación o filtración. Puede utilizarse cualquier recipiente conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo, una cápsula plana de polipropileno o poliestireno. Alternativa o adicionalmente, los materiales de malla pueden disponerse en un molde de tamaño apropiado y recubrirse por vertido o extrusión de la ATM hinchada sobre la malla. La malla recubierta puede secarse luego y, opcionalmente, el proceso de recubrimiento y secado puede repetirse una, dos, tres, o más veces.

En general, la malla puede sumergirse en la solución de ATM hasta una profundidad de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,0 cm que depende, en parte, de la magnitud de hinchamiento de la ATM hinchada y el espesor de recubrimiento deseado. Más específicamente, la malla puede recubrirse con de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 10 mg de peso seco de ATM por cm² de malla. Así, la malla puede recubrirse con 5,0, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, o 10,0 mg de ATM por cm² de malla. Dependiendo de cuántas veces se repita el proceso de recubrimiento, el recubrimiento de ATM sobre la malla puede ser de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1,0 mm de espesor. El espesor del recubrimiento puede variar dependiendo de la aplicación propuesta. Así, recubrimientos más finos pueden ser más adecuados para mallas que deban enrollarse e insertarse, por ejemplo, por medio de un trocar, mientras que pueden utilizarse recubrimientos más gruesos para mallas que deban aplicarse directamente a un tejido en necesidad de reparación.

La composición biocompatible de reparación de tejidos puede secarse por cualquier método conocido en la técnica que dé como resultado la retención de las funciones biológicas y físicas de la composición de reparación de tejidos. Los métodos de secado incluyen, sin limitación, por ejemplo, secado al aire, secado en atmósfera de, o con una corriente de, gas inerte (por ejemplo, nitrógeno o argón). La temperatura de secado puede ser la temperatura ambiente, por ejemplo, aproximadamente 25°C, o puede ser una temperatura que es moderadamente elevada con relación a la temperatura ambiente, por ejemplo 28°C, 29°C, 30°C, 31°C, 32°C, 33°C, 34°C, 35°C, 36°C, 37°C, 38°C, 39°C, 40°C, 41°C, 42°C, 43°C o 44°C. Alternativamente, la composición biocompatible de reparación de tejidos puede liofilizarse. La liofilización es un método rutinario utilizado en la técnica (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Núms. 4,619,257; 4,676,070; 4,799,361; 4,865,871; 4,964,280; 5,024,838; 5,044,165; 5,154,007; 6,194,136; 5,336,616; 5,364,756; y 5,780,295), estando disponible equipo adecuado de fuentes comerciales tales como Labconco (Kansas City, MI, EE. UU.). La liofilización implica la eliminación de agua u otro disolvente de un producto congelado por un proceso denominado sublimación. La sublimación se produce cuando un líquido congelado (sólido) pasa directamente al estado gaseoso sin pasar por la fase líquida. Los expertos en la técnica son perfectamente conocedores de las diferentes metodologías de liofilización disponibles en la técnica [véase, por ejemplo, "A Guide to Freeze-drying for the Laboratory" - una publicación de servicio para la industria por Labconco, (2004); y Franks (1994)

Proc. Inst. Refrigeration. 91: 32-39]. La liofilización puede realizarse por cualquiera de una diversidad de métodos, que incluyen, por ejemplo, los métodos de colector, lotes, o a granel.

En algunas realizaciones, las moléculas de la ATM (por ejemplo, moléculas de colágeno), con sustratos de malla, pueden reticularse químicamente (por ejemplo, unirse covalentemente) consigo mismas y/o, con el sustrato de malla.

Los agentes químicos de reticulación pueden ser homobifuncionales (tiene lugar la misma reacción química en cada extremo del enlazador) o heterobifuncionales (tienen lugar reacciones químicas diferentes en los extremos del enlazador). Las químicas disponibles para tales reacciones de unión incluyen, pero sin carácter limitante, reactividad con grupos sulfhidrilo, amino, carboxilo, diol, aldehído, cetona, u otros grupos reactivos utilizando químicas electrófilas o nucleófilas, así como reticuladores fotoquímicos que utilizan radicales alquilo o azido aromático o carbonilo. Los ejemplos de agentes químicos de reticulación incluyen, sin limitación, aldehído glutárico, carbodiimidas, bisdiazobencidina, y éster N-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida. Los reticulantes químicos están disponibles ampliamente de fuentes comerciales (por ejemplo, Pierce Biotechnology (Rockford, IL); Invitrogen (Carlsbad, CA); Sigma-Aldrich (St.Louis, MO); y US Biological (Swampscott, MA)). Los reactivos de reticulación particularmente adecuados incluyen clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDAC) y N-hidroxisulfosuccinimida (NHS).

Generalmente, la reticulación puede llevarse a cabo por hidratación de la malla recubierta o película dérmica seca directamente en una solución de un reactivo de reticulación. Alternativamente, reactivos de reticulación que son activos a pH ácido pueden añadirse a la ATM hinchada con ácido antes de verter la ATM sobre la malla o aplicarla directamente al sustrato. La duración de la reacción de reticulación puede variar conforme al agente de reticulación que se utilice, la concentración de reactivo, la procedencia de la ATM, el tipo de sustrato de malla, la temperatura de reacción y la resistencia a la tracción deseada.

Opcionalmente, las composiciones biocompatibles de reparación de tejidos pueden someterse a tratamientos a fin de disminuir la biocarga. Se espera que este proceso reduzca el nivel de microorganismos infecciosos en las composiciones biocompatibles de reparación de tejidos. Como se utiliza en el presente documento, un proceso utilizado para inactivar o destruir "sustancialmente todos" los microorganismos (por ejemplo, bacterias, hongos (incluidas las levaduras), y/o virus en las composiciones biocompatibles para reparación de tejidos es un proceso que reduce el nivel de microorganismos en las composiciones biocompatibles para reparación de tejidos en al menos 10 veces (por ejemplo, al menos: 100 veces; 1.000 veces; 10^4 veces; 10^5 veces; 10^6 veces; 10^7 veces; 10^8 veces; 10^9 veces; o incluso 10^{10} veces) en comparación con el nivel de las composiciones biocompatibles para reparación de tejidos antes del proceso. Puede utilizarse cualquier método estándar de ensayo para determinar si el proceso ha sido satisfactorio. Estos ensayos pueden incluir técnicas que miden directamente el crecimiento microbiano, por ejemplo el cultivo de muestras de frotis en medios de cultivo artificiales, o métodos de detección molecular, tales como PCR cuantitativa.

Las composiciones biocompatibles de reparación de tejidos pueden exponerse a haces de rayos γ , x, e, y/o ultravioleta (longitud de onda de 10 nm a 320 nm, por ejemplo, 50 nm a 320 nm, 100 nm a 320 nm, 150 nm a 320 nm, 180 nm a 320 nm, o 200 nm a 300 nm) a fin de reducir o eliminar el nivel de bacterias y/u hongos viables y/o virus infecciosos. Más importante que la dosis de radiación a la que se exponen las composiciones biocompatibles de reparación de tejidos es la dosis absorbida por las composiciones biocompatibles de reparación de tejidos. Aunque para composiciones biocompatibles de reparación de tejidos más gruesas la dosis absorbida y la dosis de exposición estarán generalmente próximas, en las composiciones biocompatibles de reparación de tejidos más finas la dosis de exposición puede ser mayor que la dosis absorbida. Adicionalmente, si se administra una dosis de radiación particular a una tasa de dosificación baja durante un periodo de tiempo largo (por ejemplo, dos a 12 horas), se absorbe más radiación que si se administra a una tasa de dosis alta durante un periodo de tiempo corto (por ejemplo, 2 segundos a 30 minutos). El experto en la técnica conocerá el modo de ensayar si, para una composición biocompatible de reparación de tejidos particular, la dosis absorbida es significativamente menor que la dosis a la que se exponen las composiciones biocompatibles de reparación de tejidos y cómo tener en cuenta dicha discrepancia en la selección de una dosis de exposición. Las dosis absorbidas apropiadas de irradiación con haces γ , x, o e pueden ser 6 kGy - 45 kGy, por ejemplo, 8 kGy - 38 kGy, 10 kGy - 36 kGy, 12 kGy - 34 kGy. Así, la dosis de irradiación con haces γ , x, y/o e puede ser, por ejemplo, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, o 34 kGy.

Los componentes de las composiciones biocompatibles de reparación de tejidos, la ATM fragmentada y la malla biocompatible, mezclados o separados, pueden irradiarse (a cualquiera de las dosis anteriores) en cualquier etapa de la preparación de la composición biocompatible de reparación de tejidos. Adicionalmente, la irradiación de la composición biocompatible de reparación de tejidos puede ser la segunda o incluso la tercera exposición de los componentes de la composición biocompatible de reparación de tejidos a irradiación. Así, por ejemplo, la ATM fragmentada y la malla biocompatible pueden irradiarse por separado, mezclarse para formar la composición de malla biocompatible y, después de ello, la composición de malla biocompatible puede irradiarse.

Generalmente, la composición biocompatible de reparación de tejidos se rehidrata antes del injerto o implantación. Alternativamente, la composición biocompatible de reparación de tejidos puede insertarse o implantarse sin rehidratación previa; en este caso, la rehidratación ocurre *in vivo*. Para la rehidratación, la composición biocompatible de reparación de tejidos puede incubarse en cualquier solución biológicamente compatible, por ejemplo, solución salina normal, solución salina tamponada con fosfato, lactato de Ringer o medio de cultivo de células estándar. La

composición biocompatible de reparación de tejidos se incubaba en una solución durante un tiempo suficiente para que la composición biocompatible de reparación de tejidos se hidrate por completo o recupere sustancialmente la misma cantidad de agua que contiene la mezcla a partir de la cual se preparó la composición biocompatible de reparación de tejidos. Generalmente, el tiempo de incubación en la solución de rehidratación será de aproximadamente quince segundos a aproximadamente una hora, por ejemplo, de aproximadamente cinco minutos a aproximadamente 45 minutos, o de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 30 minutos. "Aproximadamente" indica que el tiempo de incubación puede variar en hasta un 20% por encima o por debajo del valor citado. Así, un tiempo de incubación de "aproximadamente" 30 minutos puede incluir, por ejemplo, 24 minutos, 25 minutos, 26 minutos, 27 minutos, 28 minutos, 29 minutos, 30 minutos, 31 minutos, 32 minutos, 33 minutos, 34 minutos, 35 minutos, o 36 minutos. La solución de rehidratación puede reemplazarse opcionalmente con solución nueva tantas veces como se desee. La temperatura de las incubaciones será generalmente la temperatura ambiente (por ejemplo, la de la sala) o puede ser de aproximadamente 15°C a aproximadamente 40°C, por ejemplo, de aproximadamente 20°C a aproximadamente 35°C. "Aproximadamente" indica que la temperatura puede variar en hasta 2°C por encima o por debajo del valor citado. Así, una temperatura de "aproximadamente" 30°C puede incluir, por ejemplo, 28,0 °C, 28,5 °C, 29,0 °C, 2,95 °C, 30,0 °C, 30,5 °C, 31,0 °C, 31,5 °C, o 32,0 °C. La vasija que contiene la composición biocompatible de reparación de tejidos y la solución de rehidratación puede agitarse suavemente durante la incubación, en caso deseado. Después de la rehidratación, la composición biocompatible de reparación de tejidos puede conformarse o recortarse ulteriormente en una forma adecuada para implantación en un sitio particular.

III. Reparación de tejidos y órganos

Las composiciones biocompatibles de reparación de tejidos descritas en esta memoria pueden utilizarse para tratar cualquiera de una amplia gama de trastornos en los cuales es necesaria mejora o reparación de tejidos. Los defectos tisulares pueden surgir de diversas dolencias médicas, que incluyen, por ejemplo, malformaciones congénitas, lesiones traumáticas, infecciones, y resecciones oncológicas. Así, las composiciones biocompatibles de reparación de tejidos pueden utilizarse para reparar defectos en cualquier tejido blando, por ejemplo tejidos que conectan, soportan, o rodean otras estructuras y órganos del cuerpo. Las composiciones biocompatibles de reparación de tejidos pueden utilizarse también como soporte de una reparación ósea (por ejemplo, como un injerto de periostio para soportar hueso o un injerto articular para estimular la reparación de cartilago. El tejido blando puede ser cualquier tejido no óseo. El tejido blando puede ser también tejido epitelial, que cubre el exterior del cuerpo y reviste los órganos y cavidades en el interior del cuerpo. Los ejemplos de tejido epitelial incluyen, pero sin carácter limitante, epitelios escamosos simples, epitelios escamosos estratificados, epitelios cuboidales, o epitelios columnares.

El tejido blando puede ser un tejido conjuntivo, que funciona para generar y soportar otros tejidos. Un ejemplo de tejido conjuntivo es tejido conjuntivo blando (conocido también como tejido conjuntivo areolar). El tejido conjuntivo blando, que funciona para fijar los epitelios a tejidos subyacentes y para mantener los órganos en su sitio, es el tipo de tejido conjuntivo más ampliamente distribuido en los vertebrados. Se puede encontrar en la piel bajo la hoja de la dermis; donde el epitelio se une a otros tejidos; bajo el tejido epitelial de todos los sistemas del organismo que tienen aberturas externas; en el interior de las membranas mucosas de los sistemas digestivo, respiratorio, reproductor, y urinario; y rodeando los vasos sanguíneos y los nervios. El tejido conjuntivo blando recibe su nombre de la "textura" blanda de sus fibras componentes entre las que se incluyen fibras de colágeno, fibras elásticas (fibras largas, estirables a modo de hebra compuestas de la proteína elastina) y fibras reticulares (fibras ramificadas constituidas por uno o más tipos de fibras de colágeno muy finas). El tejido conjuntivo puede ser también tejido conjuntivo fibroso, tal como tendones, que fijan músculos a huesos, y ligamentos, que unen los huesos entre sí en las articulaciones. El tejido conjuntivo fibroso está compuesto fundamentalmente de fibras de colágeno estrechamente compactadas, disposición que maximiza la resistencia a la tracción. El tejido blando puede ser también tejido muscular. El tejido muscular incluye: músculo esquelético, que es responsable de los movimientos voluntarios; músculo blando, que se encuentra en las paredes del tracto digestivo, las arterias de la vejiga y otros órganos internos; y músculo cardíaco, que forma la pared contráctil del corazón.

Las composiciones biocompatibles de reparación de tejidos pueden utilizarse para reparar tejidos blandos en muchos sistemas orgánicos diferentes que cumplen una gama de funciones fisiológicas en el cuerpo. Estos sistemas orgánicos pueden incluir, pero sin carácter limitante, el sistema muscular, el sistema genitourinario, el sistema gastroenterológico, el sistema tegumentario, el sistema circulatorio y el sistema respiratorio. Las composiciones son particularmente útiles para reparaciones de tejido conjuntivo, con inclusión de la fascia, una capa especializada que rodea músculos, huesos y articulaciones, del tórax y la pared abdominal y para reparación y reforzamiento de debilidades tisulares en anatomía urológica, ginecológica y gastroenterológica.

Las composiciones biocompatibles de reparación de tejidos son muy adecuadas para la reparación de hernias. Una hernia es la protrusión del contenido de una cavidad del cuerpo fuera de la cavidad del cuerpo en la que se encuentra normalmente contenido. Estos contenidos están encerrados a menudo en la membrana delgada que reviste el interior de la cavidad del cuerpo; a la membrana y su contenido juntos se hace referencia como un "saco hernial". Muy comúnmente, las hernias se desarrollan en el abdomen, cuando un adelgazamiento en la pared abdominal se expande en un orificio o defecto localizado a través del cual se produce la protrusión intestinal. Estas debilidades de la pared abdominal ocurren típicamente en localizaciones de adelgazamiento natural de la pared abdominal, es decir, en sitios en los que existen aberturas naturales que permiten el paso de canales para vasos sanguíneos que se extienden

desde el abdomen a las extremidades y otros órganos. Otras áreas de posible debilidad son sitios de cualquier cirugía abdominal previa. Habitualmente, el tejido graso entra en primer lugar en una hernia, pero puede ir seguido de un segmento de intestino u otro órgano intraabdominal. Si un segmento de órgano interno queda atrapado en el interior del saco hernial de tal modo que el suministro de sangre al órgano se dificulte, el paciente se encuentra en riesgo de complicaciones graves que incluyen bloqueo intestinal, gangrena, y muerte. Las hernias no se curan espontáneamente y a menudo aumentan de tamaño a lo largo del tiempo, por lo que es necesaria la reparación quirúrgica para corregir la afección. En general, las hernias se reparan por reinserción del saco hernial de nuevo en la cavidad del cuerpo seguido por reparación del tejido muscular debilitado.

Existen muchas clases de hernias. Con la excepción de las hernias inguinales y escrotales, que están presentes únicamente en los varones, las hernias pueden encontrarse en sujetos de cualquier edad o sexo. Ejemplos de hernias incluyen: hernias inguinales directas, en las cuales el intestino puede aflorar en el canal inguinal a través de la pared posterior del canal inguinal; hernias inguinales indirectas, en las cuales el intestino puede aflorar en el canal inguinal a través de una debilidad en el ápice del canal inguinal; hernias femorales, en las cuales el contenido abdominal penetra en el área débil creada por la etapa de los vasos sanguíneos femorales a las extremidades inferiores; hernias escrotales, en los cuales el contenido del intestino aflora en el escroto; hernia de Spigel, en la cual la hernia ocurre a lo largo del borde del músculo recto abdominal; hernia obturadora, en la cual el contenido del abdomen (por ejemplo intestino u otros órganos abdominales) penetran en el canal obturador, hernias lumbares, por ejemplo, hernia de Petit, en la cual la hernia se produce a través del triángulo de Petit, el triángulo lumbar inferior, y hernia de Grynfeltt, en la cual la hernia se produce a través del triángulo de Grynfeltt-Lesshaft, el triángulo lumbar superior; hernia de Richter, en la cual solo una pared lateral del intestino llega a estrangularse; hernia de Hesselbach, en la cual la hernia se produce a través del triángulo de Hesselbach, hernia en pantalón, en la cual el saco hernial penetra en ambos lados de los vasos epigástricos inferiores para dar una hernia inguinal directa o indirecta combinada; hernia de Cooper; hernia epigástrica (en la cual la hernia ocurre entre el ombligo y la parte inferior de la caja torácica en la línea media del abdomen); hernias de diafragma o de hiato, por ejemplo hernia de Bochdalek y hernia de Morgagni, en las cuales una porción del estómago penetra a través del hiato diafragmático del esófago; y hernia umbilical, en la cual la protrusión es a través del ombligo.

En contraste con las hernias de origen congénito, existen también hernias de incisión, conocidas también como hernias ventrales o recurrentes, en el abdomen en el área de una cicatriz quirúrgica antigua. Las hernias de incisión tienen un mayor riesgo de reproducirse después de reparación quirúrgica que las hernias congénitas. Además, en el caso de hernias recurrentes múltiples, es decir hernias que reaparecen después que se han realizado dos o más reparaciones, la probabilidad de reparación con éxito disminuye con cada procedimiento subsiguiente.

Las composiciones biocompatibles de reparación de tejidos pueden utilizarse para tratar otras afecciones médicas que son resultado de debilidad tisular. Una condición para que las composiciones biocompatibles de reparación de tejidos sean útiles se da en la reparación de los prolapsos de órgano. El prolapso es una afección en la cual un órgano, o parte de un órgano, se cae o se desliza fuera de su sitio. El prolapso es típicamente resultado de una debilidad tisular que puede estar causada por factores congénitos, traumatismo o enfermedad. El prolapso de órganos pélvicos puede incluir prolapso de uno o más órganos dentro del cinturón pélvico; la debilidad tisular debida a embarazo, parto y alumbramiento es una causa común de la afección en las mujeres. Ejemplos de órganos implicados en prolapso de órganos pélvicos incluyen la vejiga (cistocele), que puede colapsar en la vagina; la uretra, que puede colapsar en la vagina; el útero, que puede prolapsar en la vagina; el intestino delgado (enterocele), que puede prolapsar contra la pared de la vagina; el recto (rectocele), que puede prolapsar contra la pared de la vagina; y el prolapso vaginal, en el cual una porción del canal vaginal puede penetrar a través de la abertura de la vagina. Dependiendo del órgano implicado y la gravedad del prolapso, las pacientes con prolapso orgánico pélvico pueden experimentar dolor durante el acto sexual, frecuencia urinaria, incontinencia urinaria, infección del tracto urinario, deterioro renal, y estreñimiento. Los remedios incluyen opciones tanto no quirúrgicas como quirúrgicas; en casos graves, puede ser necesaria reconstrucción de los tejidos del suelo pélvico, es decir, las fibras musculares y el tejido conjuntivo que abarcan el área bajo la pelvis y proporcionan soporte a los órganos pélvicos, por ejemplo, la vejiga, los intestinos inferiores, y el útero (en las mujeres).

Las composiciones biocompatibles de reparación de tejidos son útiles también en reparaciones del sistema gastrointestinal. Las afecciones esofágicas que precisan reparación incluyen, pero sin carácter limitante, rotura traumática del esófago, por ejemplo síndrome de Boerhaave, síndrome de Mallory-Weiss, trauma asociado con perforación iatrogénica esofágica que puede ocurrir como complicación de un procedimiento endoscópico o inserción de un tubo de alimentación o cirugía no relacionada con ello; reparación de defectos esofágicos congénitos, por ejemplo, atresia esofágica; y resección esofágica oncológica.

Las composiciones biocompatibles de reparación de tejidos pueden utilizarse para reparar tejidos que no se han reparado nunca o pueden utilizarse para reparar tejidos que se han tratado una o más veces con composiciones biocompatibles de reparación de tejidos o con otros métodos conocidos en la técnica, o pueden utilizarse junto con otros métodos de reparación de tejidos que incluyen sutura, injerto de tejido, o materiales sintéticos de reparación de tejidos.

Las composiciones biocompatibles de reparación de tejidos pueden aplicarse a un sujeto que precisa tratamiento utilizando métodos conocidos por los expertos en la técnica. Las composiciones biocompatibles de reparación de tejidos pueden: (a) envolverse alrededor de un tejido que está deteriorado o que contiene un defecto; (b) colocarse sobre la superficie de un tejido que está deteriorado o tiene un defecto; (c) enrollarse e insertarse en una cavidad, abertura, o espacio en el tejido. Una o más (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, o más) de tales reparaciones de tejido biocompatible, apiladas o adyacentes una a otra, pueden utilizarse en cualquier sitio particular. Las composiciones biocompatibles de reparación de tejidos pueden mantenerse en su lugar mediante, por ejemplo, suturas, grapas, ligaduras, o colas o selladores de tejido conocidos en la técnica. Alternativamente, si, por ejemplo, se compactan con estanqueidad suficiente en un defecto o cavidad, es posible que no se necesite dispositivo de fijación alguno.

Agentes terapéuticos

Los agentes terapéuticos que favorecen la regeneración de tejido pueden incluirse en las composiciones biocompatibles de reparación de tejidos. Estos agentes pueden incluir células, factores de crecimiento o agentes terapéuticos de molécula pequeña. Estos agentes pueden incorporarse a las composiciones biocompatibles de reparación de tejidos antes de colocar las composiciones biocompatibles de reparación de tejidos en el sujeto. Alternativamente, los mismos pueden inyectarse en la composición biocompatible de reparación de tejidos ya colocada en un sujeto. Estos agentes pueden administrarse aisladamente o en combinación. Por ejemplo, una composición biocompatible de reparación de tejidos puede utilizarse para suministrar simultáneamente células, factores de crecimiento y agentes terapéuticos de molécula pequeña, o para suministrar células más factores de crecimiento, o células más agentes terapéuticos de molécula pequeña, o factores de crecimiento más agentes terapéuticos de molécula pequeña.

Naturalmente, la administración de los agentes arriba mencionados puede ser simple, o múltiple, (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 80, 90, 100, o tantas como sean necesarias). En el caso de ser múltiple, las administraciones pueden realizarse a intervalos de tiempo fácilmente determinables por el experto en la materia. Las dosis de las diversas sustancias y factores pueden variar notablemente conforme a la especie, edad, peso, volumen, y sexo del sujeto, y el experto puede determinarlas con facilidad.

Las células viables histocompatibles pueden restablecerse en las composiciones biocompatibles de reparación de tejidos para producir un injerto aceptado de modo permanente que puede remodelar el hospedador. Las células pueden derivarse del receptor propuesto o de un donante alogénico. Los tipos de células con las cuales pueden repoblarse las composiciones biocompatibles de reparación de tejidos incluyen, pero sin carácter limitante, células no humanas del tallo embrionario (ESC), células adultas o embrionarias del tallo mesenquimático (MSC), monocitos, células del tallo hematopoyético, células epiteliales gingivales, células endoteliales, fibroblastos, o células del tallo de ligamentos periodontales, procondroblastos, condroblastos, condrocitos, proosteoblastos, osteocitos u osteoclastos. Puede utilizarse cualquier combinación de dos o más de estos tipos de células (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez) para repoblar la composición biocompatible de reparación de tejidos. Los métodos para aislar tipos específicos de células son bien conocidos en la técnica. Las células del donante pueden utilizarse inmediatamente después de su recogida o pueden cultivarse *in vitro* utilizando técnicas estándar de cultivo de tejido. Las células del donante pueden infundirse o inyectarse en la composición biocompatible de reparación de tejidos *in situ* inmediatamente antes de la colocación de la composición biocompatible de reparación de tejidos en un sujeto mamífero. Las células del donante pueden cocultivarse también con la composición de reparación de tejidos biocompatible utilizando métodos estándar de cultivo de tejido conocidos por los expertos en la técnica.

Los factores de crecimiento que pueden incorporarse a la composición biocompatible de reparación de tejidos incluyen cualquiera de una amplia gama de factores de crecimiento de células, factores angiogénicos, factores de diferenciación, citocinas, hormonas, y quimiocinas conocidas en la técnica. Los factores de crecimiento pueden ser polipéptidos que incluyen la secuencia completa de aminoácidos de un factor de crecimiento, un péptido que corresponde a solo un segmento de la secuencia de aminoácidos del factor de crecimiento natural, o un péptido que se deriva de la secuencia natural que retiene las propiedades bioactivas del factor de crecimiento natural. Cualquier combinación de dos o más de los factores puede administrarse a un sujeto por cualquiera de los medios citados a continuación. Los ejemplos de factores relevantes incluyen factores de crecimiento de células endoteliales vasculares (VEGF) (por ejemplo, VEGF A, B, C, D, y E), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento semejante a insulina (IGF) I e IGF-II, interferones (IFN) (por ejemplo, IFN- α , β , o γ), factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) (por ejemplo, FGF 1-10), factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de queratinocitos, factores de crecimiento transformante (TGF) (por ejemplo, TGF α o β), factor de necrosis tumoral- α , una interleucina (IL) (por ejemplo, IL-1 a IL-18), Osterix, Hedgehogs (por ejemplo, erizo o desierto), SOX9, proteínas morfogenéticas óseas (BMP), en particular, las BMP 2, 4, 6 y 7 (BMP-7 también se conoce como OP-1), hormona paratiroidea, calcitonina, prostaglandinas, o ácido ascórbico.

Los factores que son proteínas pueden suministrarse también a un sujeto receptor por administración al sujeto de: (a) vectores de expresión (por ejemplo, plásmidos o vectores víricos) que contienen secuencias de ácido nucleico que codifican uno cualquiera o más de los factores arriba indicados que son proteínas; o (b) células que han sido transfectadas o transducidas (de manera estable o transitoria) con tales vectores de expresión. Dichas células

transfectadas o transducidas se derivarán preferiblemente de, o serán histocompatibles con, el receptor. Sin embargo, es posible que solo se requiera una corta exposición al factor y por tanto, es posible que puedan utilizarse también células histoincompatibles.

También pueden incorporarse fármacos de molécula pequeña a la composición biocompatible de reparación de tejidos, facilitando así el suministro localizado de fármacos. Las hernias recurrentes pueden ser resistentes a la reparación, debido, en algunos casos, a colonización bacteriana indolente que debilita el sitio de reparación y retarda la curación. La administración sistémica de antibióticos a largo plazo puede ser solo parcialmente eficaz contra tales infecciones subclínicas. La incorporación de agentes antimicrobianos a la composición biocompatible de reparación de tejidos puede proporcionar concentraciones locales elevadas de antibióticos, minimizando con ello el riesgo de efectos adversos asociado con las dosis sistémicas elevadas a largo plazo. Un agente antimicrobiano puede ser un antibiótico. Los ejemplos de antibióticos incluyen, sin limitación, clases representativas de antibióticos cualesquiera, por ejemplo, 1) aminoglicosidos, tales como gentamicina, kanamicina, neomicina, estreptomycin o tobramicina; 2) cefalosporinas, tales como cefaclor, cefadroxil o cefotaximo; 3) macrólidos, tales como azitromicina, claritromicina, o eritromicina; 4) penicilinas, tales como amoxicilina, carbenicilina o penicilina; 5) péptidos, tales como bacitracina, polimixina B o vancomicina; 6) quinolonas, tales como ciprofloxacino, levofloxacino, o enoxacino; 7) sulfonamidas, tales como sulfametazol, sulfazetidina; o sulfametoxazol; 8) tetraciclinas, tales como doxiciclina, minociclina o tetraciclina; 8) otros antibióticos con mecanismos de acción diversos tales como rifampina, cloranfenicol, o nitrofurantoína. Otros agentes antimicrobianos, por ejemplo, agentes antifúngicos y agentes antivíricos pueden incluirse también en las composiciones biocompatibles de reparación de tejidos.

También pueden incluirse agentes quimioterapéuticos en las composiciones biocompatibles de reparación de tejidos. Los tumores malignos que aparecen en tejidos blandos, incluyendo por ejemplo los tumores de esófago, estómago, colon y vejiga se tratan típicamente por resección del tumor y administración sistémica de fármacos antineoplásicos. La incorporación de agentes antineoplásicos a las composiciones de reparación tejidos biocompatibles puede proporcionar altas concentraciones locales de quimioterapia, mitigando con ello la toxicidad asociada con dosis sistémicas elevadas a largo plazo. Los ejemplos de clases de agentes quimioterapéuticos incluyen, sin limitación, 1) agentes alquilantes, por ejemplo, ciclofosfamida; 2) antraciclinas, por ejemplo, daunorrubicina, doxorubicina; 3) disruptores cicloesqueléticos, por ejemplo, paclitaxel; 4) inhibidores de topoisomerasas, por ejemplo, etoposido; 5) análogos de nucleótidos, por ejemplo, azacitidina, fluorouracilo, gemcitabina; 6) péptidos, por ejemplo, bleomicina; 7) agentes basados en platino, por ejemplo, carboplatino, cisplatino; 8) retinoides, por ejemplo, ácido todo-trans-retinoico; y 9) alcaloides de la vinca, por ejemplo, vinblastina o vincristina.

IV. Artículos de Fabricación

Las composiciones biocompatibles de reparación de tejidos proporcionadas en esta memoria pueden estar incluidas en un artículo de producción o como un kit. En una realización, el kit puede incluir la composición biocompatible de reparación de tejidos, material de envasado, o un prospecto que comprende instrucciones para un método de tratamiento. El material de envasado puede incluir componentes que promueven la estabilidad y esterilidad a largo plazo de la composición biocompatible de reparación de tejidos.

Ejemplos

Ejemplo 1. Métodos y Materiales

Preparación de la matriz de tejido acelular (ATM). Se preparó ATM a partir de tejido dérmico de porcino proporcionado por minilechones de Yucatán. El tejido dérmico de porcino se procesó conforme a los protocolos estándar LifeCell como sigue. Se incubó el tejido en medio RPMI 1640 que contenía EDTA 20 mM durante 24 horas a 4°C. Se retiró la epidermis de la piel por incubación de la muestra de tejido con agitación suave en una solución de desepidermización (solución salina tamponada con fosfato (PBS), EDTA 10 mM, Triton X-100 al 0,5%, con lincomicina, vancomicina, polimixina B y cefoxitina) durante 22,5 horas a la temperatura ambiente. La capa epidérmica se separó luego físicamente de la dermis. Se desechó la epidermis y la dermis se sometió a procesamiento ulterior. Los componentes celulares y los residuos se retiraron por lavado de la dermis en solución de descelularización (HEPES 10 mM, pH 8,0, EDTA 10 mM, desoxicolato de sodio al 2 %) durante 15 minutos, seguido por agitación suave en un lote reciente de solución de descelularización durante 18 horas a la temperatura ambiente. La dermis se incubó luego en solución de ADNsa (HEPES 20 mM, pH 7,2, cloruro de calcio 20 mM, cloruro de magnesio 20 mM, y 1 U/ml de ADNsa (Pulmozyme®, Genentech, South San Francisco, CA), seguido por lavado en PBS, EDTA 10 mM, pH 7,2. La dermis tratada con ADNsa se incubó luego en solución de pre congelación y se liofilizó para producir la ATM en forma de hoja (XenoDerm™). La XenoDerm™ se micronizó utilizando un molino de congelación Spex-Certiprep. El tamaño de partícula aproximado de la XenoDerm™ micronizada estaba comprendido entre aproximadamente 100 y 200 µm. El material micronizado se utilizó como material de partida en la preparación de la malla recubierta y las películas dérmicas como se describe en los ejemplos que siguen.

Determinación del contenido en crioprotector de la dermis de porcino micronizada. 100 mg de tejido micronizado se lavaron 3 veces con agua para eliminar el crioprotector soluble. El material lavado se liofilizó y se pesó a continuación. Se determinó que la dermis de porcino micronizada estaba constituida aproximadamente por 50% de crioprotector y 50% de matriz de tejido acelular (ATM).

Hinchamiento de la ATM en ácido acético Se determinó empíricamente una concentración útil de ácido acético para hinchamiento de una matriz de tejido regenerativa (ATM). 50 mg de dermis de porcino micronizada, que contenía 26 mg de ATM, se lavaron 3 veces con agua, y se suspendieron luego en 5 ml de ácido acético a las concentraciones indicadas en la Tabla 1. Las muestras de ATM se incubaron durante 3 horas a la temperatura ambiente con mezclado ocasional. Las partículas de ATM hinchadas se dejaron sedimentar, y se registró el volumen ocupado por la ATM hinchada; después de ello, se sometieron las muestras a centrifugación a baja velocidad y se registró el volumen compactado de los sedimentos de ATM. El ácido acético 100 mM (pH aproximado de 2,6) produjo casi el hinchamiento máximo de la ATM, es decir, la magnitud de la diferencia entre volumen hinchado y compactado, como se evaluó por gravedad o centrifugación (Tabla 1). Para concentraciones menores de ácido acético, el hinchamiento de la ATM no era uniforme, produciendo una suspensión no homogénea con grandes partículas. Los intentos de aumentar la concentración de ATM a valores mayores que 0,5% de ATM (peso/volumen) dieron como resultado la formación de una suspensión no homogénea que contenía numerosas partículas que no se disipaban ni por adición de sal (cloruro de sodio 10 mM) ni por aumento del pH (>3,0).

Tabla 1: Hinchamiento de la ATM en ácido acético

Ácido acético (mM)	Volumen de ATM hinchada (ml)	Volumen de ATM compactada (ml)
0	0,4	0,4
25	3,0	2,2
50	3,6	2,6
100	4,3	2,7
250	4,8	3,0

La integridad de las fibras de colágeno en la ATM hinchada con ácido se evaluó por microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las muestras de dermis humana micronizada (Cymetra™) se rehidrataron en ácido acético 50, 100, 250 o 500 milimolar. Se eliminó el ácido por lavado en solución salina al 0,9% y las muestras se prepararon para microscopía electrónica de transmisión. Se observó la periodicidad del colágeno en fibras de colágeno individuales de todas las muestras analizadas, sin diferencia aparente alguna en el patrón de formación de bandas o el tamaño de las fibras. Se observó un aumento en la separación de las fibras de colágeno que parecía proporcional a la concentración de ácido acético utilizada para rehidratar la Cymetra™.

Ejemplo 2: Preparación y comparación de la malla de polipropileno recubierta de película y recubierta con esponja

Los pasos iniciales en la preparación de la malla recubierta de película y recubierta con esponja fueron idénticos. En resumen, la ATM se hinchó en ácido y se vertió sobre malla de polipropileno. El secado de la malla recubierta en una atmósfera de nitrógeno/aire produjo una malla recubierta uniformemente, de aproximadamente 0,5 mm de espesor, que se asemejaba a celofán; este material se denomina como "malla recubierta de película". En contraste, la liofilización de la malla recubierta dio como resultado un material de baja consistencia, de aproximadamente 2-3 mm de espesor, que se asemejaba a un ovillo de algodón; este material se denomina como "malla recubierta de esponja". Preparación de la malla de polipropileno recubierta de película. Se lavó la ATM (2,5 mg ATM/cm² de malla de polipropileno) 3 veces en agua para eliminar el crioprotector y las sales residuales, y se hinchó luego en ácido acético 100 milimolar a una concentración final de ATM al 0,5% durante 3 horas a la temperatura ambiente. La malla de polipropileno (malla PROLENE, Ethicon, Inc.) se cortó en trozos de aproximadamente 7,5 cm por 2,5 cm, y cada trozo se dispuso individualmente en un solo pocillo (8 cm x 3 cm) de una cápsula de poliestireno de 4 pocillos (Nunc, n.º de catálogo 267061). La ATM hinchada con ácido se vertió sobre la malla hasta una profundidad de aproximadamente 5 mm y la cápsula se incubó durante una noche en atmósfera de nitrógeno. La malla recubierta de película, una vez seca, se desprendió de la cápsula, se hidrató durante 15 minutos en ácido acético 100 milimolar, se invirtió y se transfirió a un recipiente de poliestireno limpio. La ATM hinchada con ácido preparada recientemente se vertió de nuevo sobre la malla recubierta de película, que se secó luego durante una noche en atmósfera de nitrógeno. La malla doblemente recubierta y seca se retiró luego del recipiente de poliestireno.

En algunos casos, la malla de ATM recubierta de película se sometió a un procedimiento de reticulación. La malla recubierta y seca se incubó durante 3 horas a la temperatura ambiente en ácido 4-morfolinetanosulfónico (MES) 100 milimolar, de pH 5,4, clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodimida (EDAC) 20 mM, N-hidroxisulfosuccinimida (NHS) 10 mM y lisina 0,5 µM. La malla reticulada se lavó en solución salina y se guardó hidratada antes de su análisis *in vitro* o *in vivo*. Preparación de la malla de polipropileno recubierta de esponja. Se lavó la ATM (2,5 mg ATM/cm² de malla de polipropileno) 3 veces en agua para eliminar el crioprotector y las sales residuales, y se hinchó luego en ácido acético 100 milimolar a una concentración final de ATM al 5% durante 3 horas a la temperatura ambiente. La malla de polipropileno (malla PROLENE, Ethicon, Inc.) se cortó en trozos de aproximadamente 7,5 cm por 2,5 cm, y cada trozo se dispuso individualmente en un solo pocillo (8 cm x 3 cm) de una cápsula de poliestireno de 4 pocillos (Nunc, n.º de catálogo 267061). La ATM hinchada con ácido se vertió sobre la malla (2,5 mg de ATM/cm² de malla) hasta una profundidad de aproximadamente 5 mm. La ATM hinchada con ácido

se vertió sobre la malla, que se liofilizó luego. La malla de poliestireno recubierta de esponja y seca se retiró luego del recipiente de poliestireno.

En algunos casos, la malla de ATM recubierta de esponja se sometió a un procedimiento de reticulación. La malla recubierta y seca se incubó durante 3 horas a la temperatura ambiente en ácido 4-morfolinetanosulfónico (MES) 100 milimolar, de pH 5,4, clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida (EDAC) 20 mM, N-hidroxisulfosuccinimida (NHS) 10 mM y lisina 0,5 µM. La malla reticulada se lavó en solución salina y se guardó hidratada antes de su análisis *in vitro* o *in vivo*.

La ATM hinchada con ácido formó películas y esponjas uniformes una vez seca. Cuando se rehidrató con tampones fisiológicos, las películas y las esponjas se mantenían intactos y conservaban su forma original. Sin tratamiento ácido, el tejido micronizado seco no lograba mantener su forma cuando se hidrataba. Biomecánicamente, las películas eran más resistentes (tanto al tacto como por ensayos cuantificables) comparados con las esponjas.

Resistencia a la tracción de las películas y las esponjas. Se prepararon películas y esponjas exactamente como se ha descrito en los métodos anteriores, excepto que se omitió de las muestras la malla de polipropileno. Las películas y las esponjas se rehidrataron y se evaluó su resistencia a la tracción utilizando un modulómetro Instron 5865 (Instron Corporation, Norwood, MA.) conforme a las especificaciones del fabricante. Los resultados de este experimento se muestran a continuación en la Tabla 2. Los valores representan el esfuerzo medio máximo de dos muestras separadas. Las películas reticuladas mostraron la mayor resistencia global y toleraron aproximadamente 20-25% del esfuerzo máximo tolerado por la ATM normal liofilizada (Xenoderm™).

Tabla 2: Resistencia a la tracción de las películas y las esponjas dérmicas

Muestra	Reticulación	Esfuerzo máximo (MPa)
Película	No	0,07
Esponja	No	0,02
Película	Sí	4,05
Esponja	Sí	0,09
hoja normal XenoDerm™	No	15-20

Temperatura de desnaturalización de la matriz extracelular de películas y esponjas. Se evaluó también el potencial de la ATM hinchada para mantenerse estable en condiciones fisiológicas por métodos *in vitro* que incluían, por ejemplo, medida de la temperatura de desnaturalización de la matriz extracelular y sensibilidad a la collagenasa de la ATM hinchada con ácido. La temperatura de desnaturalización de la matriz extracelular se evaluó por calorimetría de barrido diferencial (DSC). Se pusieron muestras hidratadas en bandejas DSC de alto volumen, se sellaron y se analizaron en un equipo DSC Q100 (TA Instruments) utilizando una temperatura de equilibrio de 2 °C con un aumento de 2,5 °C/minuto hasta 95 °C. Las películas y las esponjas se prepararon exactamente como se describe en los métodos anteriores, excepto que se omitió de las muestras la malla de polipropileno. Como se indica en la Tabla 3, la reticulación parecía aumentar la temperatura requerida para desnaturalizar la matriz de colágeno. En contraste, las temperaturas de desnaturalización de las películas y esponjas no reticuladas eran ligeramente menores que la de la dermis de porcino micronizada a partir de la cual se habían producido aquéllas, lo que indicaba que la organización estructural global del colágeno en las películas y esponjas era similar a la del colágeno nativo. Además, la temperatura de desnaturalización de las películas y esponjas era más alta que la temperatura normal del cuerpo de los mamíferos de 37°C, lo que indicaba que las películas y esponjas serían estables en condiciones fisiológicas.

Tabla 3: Temperatura de desnaturalización de las películas y esponjas dérmicas

Muestra	Reticulación	Temperatura de desnaturalización (°C)
Película	No	57
Esponja	No	57
Película	Sí	70
Esponja	Sí	70
Dermis micronizada de porcino	No	64

Análisis histológico de la malla de polipropileno recubierta de película y esponja. Se prepararon muestras de malla de polipropileno recubiertas con película y esponja como se ha descrito arriba, se cortaron luego y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E). Un material eosinofílico denso rodeaba la malla de polipropileno en las muestras de malla recubiertas con película; en contraste, un retículo flojo de material eosinofílico rodeaba la malla de polipropileno en las muestras de malla recubiertas con esponja. Los haces de colágeno, encontrados típicamente en la matriz dérmica, no se observaron en las muestras de malla de polipropileno recubiertas con película o esponja, aunque se

apreciaban artefactos histológicos asociados con la parafina incluida en la malla, lo que sugería la necesidad de su inclusión en el plástico antes del seccionamiento.

Ejemplo 3: Biocompatibilidad de la malla de polipropileno recubierta de película y esponja

La biocompatibilidad de la malla recubierta de película y esponja se evaluó in vivo en un experimento de evolución temporal utilizando un modelo de rata inmunocompetente. Las muestras de malla recubiertas con película y esponja, preparadas con y sin reticulación como se describe en el Ejemplo 2, se implantaron subdérmicamente y se retiraron para análisis al cabo de 1, 3 y 5 semanas después de la implantación. Las muestras de control incluían malla de polipropileno sin recubrir y Xenoderm™ en hoja. Se implantaron tres réplicas de cada artículo de ensayo para cada punto temporal. Los implantes se insertaron en bolsas subdérmicas pequeñas (4 por rata) creadas en la superficie dorsal de los animales. Después de la inserción de los artículos de ensayo, se cerraron las heridas con grapas quirúrgicas.

Se realizó el análisis histológico cualitativo de los explantes para evaluar la repoblación celular, la vascularización, la inflamación y la persistencia de la matriz extracelular implantada. La repoblación celular y la vascularización se valoraron por evaluación de secciones histológicas con hematoxilina y eosina; la inflamación se evidenció por la presencia de células con núcleos redondos teñidos intensamente; la persistencia de la matriz extracelular se evidenció por una tinción eosinofílica rosada uniforme, característica del citoplasma celular y las proteínas de la matriz extracelular.

Los análisis histológicos indicaban que las muestras de control de malla de polipropileno sin recubrimiento exhibían una respuesta fibrótica inflamatoria densa 1 semana después de la implantación, que disminuía solo ligeramente 3 y 5 semanas después de la implantación. El control positivo, XenoDerm™ en hoja que, como se ha descrito arriba, carece de un componente de malla de polipropileno, exhibía una respuesta inflamatoria relativamente menor en el sitio de implantación, con una repoblación incrementada a lo largo del curso del periodo de tiempo de 5 semanas. Tanto la malla de polipropileno recubierta de esponja como la malla de polipropileno recubierta de esponja reticulada eran frágiles y tendían a desprenderse durante el procedimiento de implantación. Se observaron respuestas inflamatorias similares a la observada para las muestras de control de malla de polipropileno sin recubrir, tanto para las muestras de esponja no reticuladas como para las reticuladas, aunque estaban todavía presentes pequeñas áreas de matriz extracelular en las últimas cinco semanas después de la implantación. Se observó inflamación moderada tanto para la malla de polipropileno recubierta de película como para las muestras de malla de polipropileno recubiertas con película reticuladas. No obstante, se observó persistencia de matriz extracelular, así como repoblación celular, para las muestras de malla de polipropileno recubiertas con película a lo largo del periodo de tiempo de 5 semanas, en tanto que no se observó evidencia alguna de repoblación celular para las muestras de malla de polipropileno reticuladas recubiertas de película. Así, las preparaciones de malla recubiertas de película exhibían el grado máximo de biocompatibilidad basadas en la persistencia de la ATM, un nivel de inflamación relativamente bajo, y la capacidad para repoblarse y revascularizarse.

Ejemplo 4: Preparación de malla de polipropileno y películas dérmicas utilizando un método de secado térmico

La malla de polipropileno recubierta de película utilizada en los Ejemplos 7, 10 y 11 y las películas dérmicas utilizadas en los Ejemplos 5, 6, 7, 8, y 9 se prepararon como sigue.

Las películas dérmicas ilustradas en la presente memoria no forman parte de la invención reivindicada. Preparación de la malla de polipropileno recubierta de película. La hoja XenoDerm™ liofilizada se micronizó de acuerdo con el método descrito anteriormente. La ATM se lavó en agua para eliminar el crioprotector y las sales residuales, y se hinchó luego en ácido acético 100 mM a una concentración final de ATM al 0,5% durante 3 horas. Las temperaturas de hinchamiento estaban comprendidas de 32 a 40°C como se detalla en los Ejemplos específicos que siguen. La ATM hinchada con ácido se vertió en una cápsula de poliestireno y la malla de poliestireno (trozos de 7,5 cm x 2,5 cm) se sumergió en la solución de ATM hasta una profundidad de aproximadamente 1 cm; se utilizaron 0,75 mg de ATM hinchada con ácido por cm² de malla de polipropileno. La malla de polipropileno se recubrió una sola vez. Las muestras se secaron como se indica más adelante en los Ejemplos 7, 10 y 11. Preparación de las películas dérmicas. Se prepararon películas dérmicas, que no contenían malla de polipropileno, como sigue. La hoja XenoDerm™ liofilizada se micronizó de acuerdo con el método descrito anteriormente. La ATM se lavó en agua para eliminar el crioprotector y las sales residuales, y se hinchó luego en ácido acético 100 mM a una concentración final de ATM al 0,5% durante 3 horas. Las temperaturas de hinchamiento estaban comprendidas de 32 a 40°C como se detalla en los Ejemplos específicos que siguen. La solución de ATM hinchada con ácido se vertió en una cápsula de poliestireno hasta una profundidad de aproximadamente 0,5 cm; se utilizaron 0,75 mg de ATM hinchada con ácido por cm² de la cápsula de poliestireno. Las muestras se secaron como se indica a continuación en los Ejemplos 5, 6, 8, y 9.

Ejemplo 5: Temperatura de desnaturalización de la matriz extracelular de las películas dérmicas.

Se prepararon películas dérmicas como se describe en el Ejemplo 4 anterior utilizando ATM que se había hinchado a la temperatura ambiente; las películas se secaron en atmósfera de nitrógeno a la temperatura ambiente o en un bloque de calentamiento a 33°C, 37°C, o 43°C. Se incluyeron como control positivo películas que se habían preparado usando el método de reticulación descrito en el Ejemplo 3. Los perfiles de desnaturalización de la matriz extracelular de los

materiales resultantes se evaluaron por calorimetría de barrido diferencial (DSC). Como se indica en la Tabla 5, las temperaturas de desnaturalización de las películas secadas a 33°C y 37°C fueron similares a las de películas de control que se habían secado a la temperatura ambiente, mientras que la temperatura de desnaturalización de las películas secadas a 43°C era reducida con relación a las películas de control. La reticulación parecía aumentar la temperatura requerida para desnaturalizar la matriz de colágeno. Estos datos sugerían que, como la temperatura de desnaturalización de las películas era mayor que la temperatura corporal normal de los mamíferos de 37°C, las películas serían estables a las temperaturas fisiológicas.

Tabla 5: Desnaturalización térmica de las películas dérmicas

Temperatura de secado (°C)	Reticulación	Temperatura de desnaturalización (°C)
Temperatura ambiente	No	53
33	No	55
37	No	55
43	No	50
temperatura ambiente	Sí	72

Ejemplo 6: Sensibilidad de las películas dérmicas a las collagenasas.

El potencial para que el recubrimiento de ATM persista en condiciones fisiológicas se evaluó también por medida de la sensibilidad de las películas dérmicas a las collagenasas. Óptimamente, el recubrimiento de ATM debería persistir lo bastante para permitir la repoblación celular de la matriz, pero manteniendo lo suficiente la estructura nativa del colágeno para permitir la renovación normal del colágeno. Se prepararon películas dérmicas como se describe en el Ejemplo 4 anterior utilizando ATM que se había hinchado a la temperatura ambiente secada en atmósfera de nitrógeno a la temperatura ambiente o sobre un bloque de calentamiento a 33°C, 37°C y 43°C. Algunas películas que se habían preparado utilizando el método de reticulación descrito en el Ejemplo 3 anterior se incluyeron como controles positivos. Las muestras se digirieron con collagenasa y el porcentaje de colágeno remanente en cada muestra, con relación a la muestra sin digerir, se ensayó después de 1, 2, 4, 6, y 24 horas de tratamiento con collagenasa. Para la digestión con collagenasa, se pusieron 15-20 mg de película seca en un tubo Eppendorf. Cada muestra se hidrató en 1 ml de Tris 10 mM, pH 7,4, CaCl₂ 5 mM, seguido por la adición de 0,25 mg de collagenasa (25 µl de una solución de 10 mg/ml) y se incubó a 37°C. En los momentos indicados, se enfriaron las muestras en hielo y el material insoluble (no digerido) se recogió por centrifugación. Los sedimentos se secaron luego y se pesaron para determinar el porcentaje de tejido remanente. Como se indica en la Tabla 6, las películas reticuladas eran casi completamente resistentes a la degradación por las collagenasas. Las películas secadas a temperaturas elevadas parecían ser ligeramente más sensibles a las collagenasas que las secadas a la temperatura ambiente. El aparente aumento de material en algunos de los últimos puntos temporales para algunas de las muestras refleja variabilidad en el contenido residual de humedad de los tamaños de muestra pequeños. Estos datos indicaron que el colágeno en las películas dérmicas era accesible a la collagenasa y no se desnaturalizaba irreversiblemente, lo que sugiere que las fibrillas de colágeno en la malla recubierta de ATM estarían sujetas a la renovación fisiológica normal del colágeno.

Tabla 6: Sensibilidad de las películas dérmicas a las collagenasas: porcentaje de colágeno remanente a lo largo del tiempo.

Tiempo de digestión con collagenasa (Horas)	Temperatura de secado de la muestra (°C)				
	Temperatura ambiente	33	37	43	Temperatura ambiente, reticulada
1	64%	30%	45%	8%	90%
2	25%	12%	18%	5%	92%
4	15%	10%	15%	10%*	93%
6	10%	20%*	18%*	20%*	92%
24	0%	2%	0%	15%*	80%

Los porcentajes se refieren a porcentajes de colágeno remanentes en la muestra después del tratamiento con collagenasa

Ejemplo 7: Biocompatibilidad de la malla recubierta: Evaluación en un modelo subdérmico de rata inmunocompetente

Se evaluó el efecto de la temperatura de preparación sobre la biocompatibilidad de las muestras de malla recubiertas en un modelo subdérmico de rata inmunocompetente. Resumidamente, la temperatura de hinchamiento de la ATM y la temperatura de secado de la malla recubierta se modificaron sistemáticamente conforme a las condiciones siguientes de la Tabla 7. Se implantaron las muestras de malla recubierta, y los implantes se retiraron y evaluaron histológicamente a intervalos de 1, 3 y 5 semanas después de la implantación.

Los grupos experimentales se designaron de la A a F, y se sometieron a las condiciones siguientes. Las muestras B-F se sumergieron en la suspensión de fragmentos de ATM hinchada relevante, y se trataron luego como sigue. Las muestras C y D se prepararon a partir de ATM que se había hinchado en ácido acético 0,1 molar a temperatura ambiente. Después del recubrimiento, la muestra C se secó a 37°C y la muestra D se secó a 40°C. La muestra E se preparó a partir de ATM que se había hinchado en ácido acético 0,1 molar a 37°C; la muestra F se preparó a partir de ATM que se había hinchado en ácido acético 0,1 M a 40°C. Ambas muestras E y F se secaron a la temperatura ambiente. La muestra B se preparó a partir de ATM que se había hinchado en ácido acético 0,1 m a la temperatura ambiente, se había recubierto a la temperatura ambiente y se había secado luego a la temperatura ambiente. La muestra A, un control respecto a factores relativos al recubrimiento en general era malla de polipropileno sin recubrir. Todas las muestras se secaron en atmósfera de nitrógeno.

Tabla 7: Diseño experimental del estudio de biocompatibilidad

t	Malla de polipropileno	Temperatura de hinchamiento (°C)	Temperatura de secado (°C)
A	No recubierta	no aplicable	no aplicable
B	recubierta	TA ^a	TA ^a
C	recubierta	TA ^a	37°
D	recubierta	TA ^a	40°
E	recubierta	37°	TAa
F	recubierta	40°	TAa
a. TA = temperatura ambiente			

Los explantes se retiraron al cabo de 1, 3 y 5 semanas después de la implantación, y se analizaron histológicamente respecto a evidencia de persistencia, repoblación celular, vascularización, e inflamación utilizando los mismos criterios descritos en el Ejemplo 2. Los análisis histológicos indicaron que todos los materiales recubiertos se mantenían intactos durante el periodo completo de implantación de 5 semanas. Todos los materiales recubiertos estaban repoblados y revascularizados. El nivel de respuesta inflamatoria inducido por las muestras de malla recubiertas (Muestras B-F) parecía ser relativamente reducido comparado con el inducido por la malla no recubierta (Muestra A). Se observaba solo una inflamación leve a moderada con todas las muestras de malla recubiertas. Este experimento confirmaba que el tratamiento térmico suave de la ATM, que daba como resultado una resistencia biomecánica incrementada de la malla recubierta, no afectaba a la actividad in vivo de las muestras de malla recubierta resultantes.

Ejemplo 8: Análisis bioquímico de las películas dérmicas

Se evaluó el efecto de la temperatura de preparación sobre la composición bioquímica de las películas dérmicas. Resumidamente, se prepararon películas dérmicas, como se describe en el Ejemplo 5, con ATM que se había hinchado en ácido acético 0,1 M bien a temperatura ambiente o 32°C, 37°C, o 40°C; las películas se secaron a la temperatura ambiente. La composición bioquímica de las películas dérmicas resultantes se comparó con la de la ATM micronizada. Análisis del colágeno. El contenido de colágeno de las películas dérmicas se evaluó cuantitativamente, por análisis de hidroxiprolina, y cualitativamente, por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida. Para el análisis de hidroxiprolina, las películas dérmicas se trataron secuencialmente con sal, ácido acético 0,5 M y se digirieron con pepsina y las fracciones solubles de cada uno se analizaron respecto a contenido de hidroxiprolina. El contenido de hidroxiprolina de las fracciones de sal, ácido y pepsina se determinó después de hidrólisis en ácido clorhídrico 6 N durante 24 horas a 110°C. Las muestras hidrolizadas se diluyeron con agua destilada a una concentración final de HCl 0,1 N. Se añadió luego tampón de ensayo (45,6 g/l de acetato de sodio trihidratado, 30 g/l de citrato trisódico dihidratado, 4,4 g/l de ácido cítrico, 308,4 ml/l de isopropanol y 1,4 % de cloramina T) junto con isopropanol adicional y reactivo de Ehrlich (2 g de para-dimetilamina-benzaldehído en ácido perclórico al 60 % (v/v), isopropanol; 3:13). Las muestras se calentaron a 60°C durante 25 minutos, se dejaron enfriar y se determinó la absorbancia a 540 nm. La hidroxiprolina se cuantificó por comparación de la absorbancia de las muestras de ensayo con la de una curva estándar que utilizaba concentraciones conocidas de hidroxiprolina. El contenido de hidroxiprolina de las fracciones extraídas se muestra en la Tabla 8. La hidroxiprolina se expresa como porcentaje de hidroxiprolina recuperada total.

Tabla 8: Distribución de hidroxiprolina (%) en las películas dérmicas

Fracción	Muestra				
	ATM micronizada	ATM hinchada con ácido (TA)	ATM hinchada con ácido (32°C)	ATM hinchada con ácido (37°C)	ATM hinchada con ácido (40°C)
Extraída con sal	9	25	33	31	27
Extraída con ácido	14	4	4	2	2
Digerida con pepsina	77	71	63	67	71

Los datos representados en la Tabla 8 indican que, basándose en la distribución relativa de hidroxiprolina, todas las muestras de película dérmica exhibían un aumento en los niveles de colágeno extraíble con sal y una disminución en los niveles de colágeno extraíble con ácido con relación a los encontrados en la ATM micronizada. No se observó cambio significativo alguno para el colágeno soluble en pepsina. Estos datos indicaban que la destrucción del colágeno en la fracción principal soluble en pepsina no se modificaba significativamente durante el proceso utilizado para crear las películas. El tratamiento ácido utilizado para crear las películas parecía cambiar la distribución del colágeno de la fracción de extraíble con ácido a la extraíble con sal.

El colágeno solubilizado con pepsina obtenido a partir de las muestras de película dérmica dérmico se analizó por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE). La SDS-PAGE se realizó de acuerdo con métodos estándar. Se compararon muestras de colágeno tipo I purificado, colágeno tipo III purificado, colágeno solubilizado con pepsina procedente del material de partida de ATM hidrolizada, y colágeno solubilizado con pepsina procedente de películas dérmicas preparadas con ATM que se había hinchado en ácido acético 0,1 M a la temperatura ambiente, 32°C, 37°C, o 40°C. No se observaron en ningún caso diferencias cualitativas, tales como, por ejemplo, diferencias debidas a reticulación o degradación del colágeno, en los perfiles de colágeno entre la ATM micronizada y cualquiera de las muestras de película dérmica. La ATM micronizada y las muestras de película dérmica estaban compuestas fundamentalmente de colágenos tipo I y tipo III. Análisis de proteoglicanos (decorina). Se extrajeron los proteoglicanos del material de partida de ATM micronizada y de películas dérmicas preparadas con ATM que se había hinchado en ácido acético 0,1 M a la temperatura ambiente, 32°, o 37°C. Los proteoglicanos se resolvieron por SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana para inmunotransferencia. La inmunotransferencia se realizó de acuerdo con métodos estándar. La membrana se sondeó con un anticuerpo policlonal específico de decorina. En todas las muestras fueron detectables niveles comparables de decorina; no se apreció evidencia alguna de degradación o reticulación. Análisis de glicosaminoglicanos. Los glicosaminoglicanos se extrajeron del material de partida de ATM micronizada y de películas dérmicas preparadas con ATM que se había hinchado en ácido acético 0,1 M a la temperatura ambiente, 32°C, 37°C, o 40°C. Los glicosaminoglicanos se resolvieron por electroforesis en acetato de celulosa conforme a métodos estándar. En todas las muestras fueron detectables ácido hialurónico y sulfato de condroitina, y no se observó diferencia cualitativa alguna en los perfiles de glicosaminoglicanos.

Ejemplo 9: Análisis biomecánico de las películas dérmicas

Se evaluó el efecto de la temperatura de preparación sobre las propiedades biomecánicas de las películas dérmicas. Resumidamente, se prepararon películas dérmicas con ATM que se había hinchado en ácido acético 0,1 M a la temperatura ambiente, 32°C, 37°C, o 40°C, como se describe en el Ejemplo 5, se secaron en atmósfera de nitrógeno, y se sometieron tiras de 1 cm de las películas dérmicas a ensayos de tracción utilizando una máquina de ensayos Instron 5865 (Instron Corporation, Norwood, MA). Los datos presentados en la Tabla 9 indican que los películas preparados con ATM que se había hinchado a temperaturas elevadas tenían una resistencia a la tracción mayor con relación a los películas que se habían preparado con ATM que se había hinchado a la temperatura ambiente. La temperatura óptima para alcanzar un máximo en las propiedades biomecánicas era aproximadamente 37°C. Así, por ejemplo, la tensión máxima para las películas preparadas con malla que se había hinchado a la temperatura ambiente era $0,017 \pm 0,007$ MPa; el valor correspondiente para las películas preparadas con malla que se había hinchado a 37°C era $0,123 \pm 0,009$ MPa. El módulo de Young para los películas preparados con malla que se había hinchado a la temperatura ambiente era $9,25 \pm 0,096$ MPa; el valor correspondiente para los películas preparados con malla que se había hinchado a 37°C era $46,0 \pm 3,00$ MPa. La carga máxima para las películas preparadas con malla que se había hinchado a la temperatura ambiente era $0,056 \pm 0,002$ N; el valor correspondiente para los películas preparados con malla que se había hinchado a 37°C era $0,0337 \pm 0,024$ N. La deformación porcentual para las películas preparadas con malla que se había hinchado a la temperatura ambiente era $21,1 \pm 1,0$ %; el valor correspondiente para las películas preparadas con malla que se había hinchado a 37°C era $49,3 \pm 3,5$ %.

Tabla 9: Propiedades biomecánicas de las películas dérmicas

Muestra				
Parámetro	ATM hinchada con ácido (TA)	ATM hinchada con ácido (32°C)	ATM hinchada con ácido (37°C)	ATM hinchada con ácido (40°C)
Esfuerzo máximo (MPa)	0,017 ± 0,007	0,094 ± 0,025	0,123 ± 0,009	0,082 ± 0,024
Módulo de Young (MPa)	9,25 ± 0,096	39,00 ± 9,00	46,0 ± 3,00	29,75 ± 8,88
Carga Máxima (N)	0,056 ± 0,002	0,291 ± 0,087	0,337 ± 0,024	0,214 ± 0,062
Deformación porcentual	21,1 ± 1,0	46,6 ± 3,0	49,3 ± 3,5	48,5 ± 3,4

Ejemplo 10: Análisis in vivo de la malla recubierta en un sistema modelo de hernia de rata

5 La biocompatibilidad de la malla recubierta se evaluó también en un sistema modelo de hernia de rata clínicamente relevante. Se crearon defectos de escisión de espesor total (aproximadamente 1,5 cm x 2,5 cm) en la fascia de la pared ventral abdominal de las ratas. Los defectos se repararon poniendo una malla del artículo de ensayo de 3 cm x 5 cm (polipropileno o híbrido) con forma ovalada en posición de refuerzo y fijando la malla en el borde de la herida mediante suturas. La malla recubierta de película se preparó esencialmente de acuerdo con el método descrito en el

10 Ejemplo 5. La ATM se hinchó a 37°C y se vertió en cápsulas de poliestireno. Se sumergió la malla en la solución de ATM hasta una profundidad de 0,5 cm; se utilizaron 0,75 mg ATM/cm² de malla de polipropileno. Para estos experimentos, se recubrió un trozo grande de malla (aproximadamente 11 cm x 18 cm) como se ha descrito arriba, se secó a la temperatura ambiente y se cortó luego en pequeños óvalos (3 centímetros x 5 cm) antes de la implantación). Las muestras no se reticularon.

15 Se crearon defectos de escisión (aproximadamente 1,5 cm x 2,5 cm) en el abdomen de las ratas y se repararon con malla de polipropileno o malla de hernias híbrida utilizando una técnica de refuerzo sin tensión. Los defectos se crearon por retirada de un trozo de forma ovalada del tejido de fascia utilizando tijeras. Se insertaron los artículos de malla de ensayo en el defecto y se ligaron en el borde de la herida utilizando 6 suturas espaciadas uniformemente. El estudio

20 utilizó 16 ratas, recibiendo 8 ratas implantes de polipropileno y 8 ratas implantes de malla híbrida. Se analizaron cinco ratas de cada grupo 4 semanas después de la implantación y las 3 ratas restantes 8 semanas después de la implantación. Para el análisis, se recogieron explantes y sometieron a evaluación macroscópica e histológica. El recubrimiento porcentual del área de la superficie fue estimado por un investigador que desconocía la identidad de cada muestra. Se observaron adhesiones omentales extensas después de inspección de los explantes de

25 polipropileno (implicación aproximada de 65 % del área de la superficie); las adhesiones omentales generadas por los explantes de malla recubiertos implicaban solo aproximadamente 18% del área de la superficie. Adicionalmente, se observaron adhesiones viscerales (hígado e intestino) en dos de los animales reparados con malla de polipropileno, y estaban ausentes en los animales reparados con la malla híbrida. Se observaron indicadores de una respuesta regenerativa, que incluía repoblación de células, revascularización, inflamación mínima y persistencia del injerto

30 después del análisis histológico de las muestras de malla híbrida a las 4 semanas de la implantación. Todos los artículos de ensayo recubiertos (con la excepción de dos muestras que contenían infecciones activas) se caracterizaban por repoblación con células semejantes a fibroblastos, revascularización, inflamación mínima y persistencia del recubrimiento biológico. En contraste, los artículos de ensayo de polipropileno estaban asociados con una mayor respuesta celular alrededor de las fibras de polipropileno consistente con una respuesta agresiva de cuerpo

35 extraño a los artículos de ensayo de malla implantados.

Ejemplo 11: Preparación de malla recubierta utilizando ATM procedente de cerdos Yorkshire

40 Se preparó la ATM de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 1, excepto que el tejido dérmico procedía de cerdos Yorkshire. La ATM se micronizó y se lavó luego en agua para eliminar el crioprotector soluble. La ATM micronizada se hinchó durante 3 horas a 37°C de acuerdo con el método del Ejemplo 1, excepto que el hinchamiento tuvo lugar en HCl 40 mM (pH 1,4) en lugar de ácido acético 100 mM. La malla de polipropileno se recubrió como se describe en el Ejemplo 2 y se secó a la temperatura ambiente.

45 La biocompatibilidad de la malla recubierta se evaluó en un sistema modelo de hernia de rata como el descrito en el Ejemplo 8. Se observaron indicadores de una respuesta regenerativa, que incluían repoblación de células, revascularización, e inflamación mínima por análisis histológico de las muestras de malla híbrida a las 4 semanas después de la implantación.

50

REIVINDICACIONES

1. Un método de producción de una composición de malla biocompatible, comprendiendo el método:

- 5 a) incubar una pluralidad de fragmentos de una matriz dérmica de tejido acelular (ATM) en una solución ácida para crear una suspensión homogénea de fragmentos de ATM hinchados, en el que la solución ácida tiene un pH menor que 3,0 y no produce desnaturalización irreversible sustancial de las fibras de colágeno en la ATM, en el que comprende un tejido dérmico del que se han eliminado todas, o prácticamente todas, las células viables;
- 10 b) aplicar la suspensión homogénea a un sustrato de malla biocompatible sintética para crear un sustrato de malla recubierto; y
- c) secar el sustrato de malla biocompatible sintética seco para formar una composición sintética recubierta.

2. El método de la reivindicación 1, en el que los pasos (a) y (b) se realizan simultáneamente.

15 3. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que la solución ácida es una solución que comprende un ácido seleccionado del grupo constituido por ácido acético, ácido ascórbico, ácido bórico, ácido carbónico, ácido cítrico, ácido clorhídrico, ácido láctico, ácido tánico, ácido fosfórico, y ácido sulfúrico.

20 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el sustrato de malla biocompatible sintética es absorbible.

5. El método de la reivindicación 4, en el que el sustrato es un polímero seleccionado del grupo constituido por polihidroxialcanoato, ácido poliglicólico, ácido poli-1-láctico, ácido poliláctico/poliglicólico (PLGA), poliglactina 910, y carboximetilcelulosa, o comprende poli-4-hidroxibutirato.

25 6. El método de la reivindicación 1, en el que el sustrato de malla biocompatible sintética comprende polipropileno.

7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el secado comprende secado en atmósfera de nitrógeno o comprende liofilización.

30 8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende adicionalmente incubar la suspensión homogénea de ATM a una temperatura de 20°C a 42°C.

35 9. Una composición de malla biocompatible que comprende: un sustrato de malla sintética recubierta, en el que el recubrimiento del sustrato de malla comprende una suspensión de ATM seca, en la que la suspensión de ATM comprende una pluralidad de fragmentos de ATM dérmica hinchados en una solución ácida, en la que la solución ácida tiene un pH menor que 3,0, y no produce desnaturalización irreversible sustancial de las fibras de colágeno en la ATM, en la que la ATM comprende un tejido dérmico del que se ha retirado la totalidad, o prácticamente la totalidad, de células viables.

40 10. La composición de la reivindicación 9, en la que los fragmentos de ATM se incuban a una temperatura de 30°C a 42°C.

45 11. La composición de malla biocompatible de la reivindicación 9 o la reivindicación 10 para su uso en la mejora o reparación de un órgano o tejido en un sujeto mamífero.

12. La composición de la reivindicación 11, en la que el órgano o tejido a tratar o reparar se selecciona del grupo constituido por tejido de la pared abdominal, músculo abdominal, y tejido muscular liso.

50 13. La composición de la reivindicación 12 para su uso en la reparación de un defecto seleccionado del grupo constituido por una hernia inguinal, una hernia femoral, una hernia ventral, una hernia abdominal, una hernia incisional, una hernia de hiato, una hernia de diafragma, una hernia umbilical, debilidad fascial en el tórax, debilidad fascial en la pared abdominal, y prolapso de órgano pélvico.

55