

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 516 698**

51 Int. Cl.:

A61K 38/39 (2006.01)

C07K 14/78 (2006.01)

A61K 35/12 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.10.2007 E 07867216 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.08.2014 EP 2076279**

54 Título: **Composiciones de colágeno placentario (telopéptido) nativo**

30 Prioridad:

06.10.2006 US 850131 P

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

31.10.2014

73 Titular/es:

**ANTHROGENESIS CORPORATION (100.0%)
7 Powder Horn Drive
Warren NJ 07059, US**

72 Inventor/es:

**BHATIA, MOHIT;
LUGO, CHRIS;
YE, QIAN y
EDINGER, JAMES W.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 516 698 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 de colágeno placentario (telopeptido) nativo

1. Solicitud relacionada anterior

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos Número 60/850.131, presentada el 6 de Octubre de 2006.

2. Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones que comprenden colágeno placentario telopeptídico tratado con detergente, tratado con álcali, a métodos de preparación de las composiciones y a métodos para su uso.

3. Antecedentes de la invención

10 El colágeno es una proteína que forma muchas estructuras en el organismo, incluyendo tendones, huesos, dientes y láminas que soportan piel y órganos internos. El colágeno se compone de tres cadenas, unidas en una triple hélice. La estructura procede de repeticiones de tres aminoácidos. En las hélices, cada tercer aminoácido es glicina y muchos de los aminoácidos restantes son prolina o hidroxiprolina.

15 El colágeno se ha utilizado comercialmente y clínicamente durante algún tiempo. Actualmente, el colágeno se puede usar para reemplazar o aumentar el tejido conectivo duro o blando, tal como piel, tendones, cartílago, hueso e intersticio. El colágeno sólido se ha implantado quirúrgicamente, y las formulaciones inyectables de colágeno están ahora disponibles para la administración más conveniente. Actualmente, varias composiciones de colágeno inyectables están disponibles en el mercado incluyendo Zyderm[®], Zyplast[®], CosmoDerm[®] y CosmoPlast[®].

20 Cada composición de colágeno tiene propiedades físicas concretas que pueden ser ventajosas o desventajosas para su uso en técnicas concretas. Existe por lo tanto una necesidad en la técnica de composiciones de colágeno con propiedades físicas adicionales para expandir la selección de composiciones disponibles para los profesionales expertos en la técnica.

4. Compendio de la invención

25 La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de composiciones de colágeno que son útiles, por ejemplo, para aumentar o reemplazar tejido de un mamífero. En ciertas realizaciones, las composiciones de colágeno se preparan sustancialmente con alto rendimiento de colágeno a partir de un tejido de origen. En ciertas realizaciones, las composiciones de colágeno de la invención muestran reducción de la contaminación, p. ej., contaminación por contaminantes de proteínas celulares y/u otros. En ciertas realizaciones de la invención, las composiciones de colágeno de la invención muestran ventajosamente una baja toxicidad. En ciertas realizaciones de la invención, las composiciones de colágeno proporcionan una fuente ventajosa para la preparación de composiciones de colágeno placentarias telopeptídicas.

30 En la presente memoria se proporcionan composiciones que comprenden, colágeno telopeptídico tratado con detergente, tratado con álcali. Se ha descubierto que tales composiciones se pueden preparar fácilmente a partir de relativamente pocas etapas, incluso partiendo de tejidos de mamíferos como fuente. Las composiciones proporcionadas en la presente memoria están sustancialmente libres de restos celulares, restos subcelulares y/o proteínas contaminantes tales como fibronectina, laminina, citoquinas y factores de crecimiento. Ciertas composiciones proporcionadas en la presente memoria comprenden un alto contenido de colágeno. En ciertas realizaciones, las composiciones comprenden al menos 90% de colágeno, en comparación con la cantidad total de proteína en la composición. La composición de colágeno carece substancialmente de laminina y/o fibronectina (por ejemplo, la composición comprende menos de 1% de laminina y/o fibronectina cada una en peso seco, o carece de fibronectina y/o laminina detectables).

35 En otro aspecto, la presente invención proporciona procedimientos para la preparación de colágeno placentario telopeptídico tratado con detergente, tratado con álcali. Aunque la fuente de tejido placentario puede ser cualquier mamífero, se utiliza placenta humana en ciertas realizaciones. El tejido placentario puede ser de cualquier parte de la placenta incluyendo el amnios, ya sea soluble o insoluble o ambos, el corion y el cordón umbilical, o de placenta completa. En ciertas realizaciones, el colágeno placentario se prepara a partir de placenta humana completa después de la eliminación del cordón umbilical.

40 En ciertas realizaciones, los procedimientos comprenden un choque osmótico de tejido placentario. Aunque no se pretende estar ligado a ninguna teoría de funcionamiento concreta, se cree que el choque osmótico puede reventar las células en el tejido facilitando así la eliminación de las células, los componentes celulares y componentes de la sangre. La etapa de choque osmótico puede producir composiciones de colágeno de la invención con una pureza ventajosa. El choque osmótico puede llevarse a cabo en condiciones de choque osmótico cualesquiera conocidas por los expertos en la técnica. En realizaciones concretas, el choque osmótico se lleva a cabo mediante incubación en condiciones de alta salinidad, seguido de incubación en una disolución acuosa. Las incubaciones se pueden

repetir según el criterio de los expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, se repiten dos veces o más.

Tras el choque osmótico, la composición de colágeno resultante puede ser tratada con detergente. El detergente puede ser cualquier detergente conocido por los expertos en la técnica que sea capaz de solubilizar los componentes celulares de proteínas y lípidos del tejido de origen. En ciertas realizaciones, el detergente es iónico, tal como dodecilsulfato de sodio o desoxicolato. En ciertas realizaciones, el detergente es no iónico, tal como un detergente TWEEN® o un detergente TRITON-X®. En ciertas realizaciones, el detergente es zwitteriónico. En otras ciertas realizaciones, el detergente es dodecilsulfato de sodio (SDS). En ciertas realizaciones, la composición de colágeno se pone en contacto con el detergente en condiciones evidentes para un experto en la técnica para la solubilización de componentes celulares o subcelulares del tejido de origen. El tratamiento con detergente se puede repetir de acuerdo con el criterio de los expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, se repite dos veces o más.

En realizaciones, la composición de colágeno se trata en condiciones alcalinas. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la composición de colágeno se puede poner en contacto con una disolución alcalina, p. ej., una disolución de hidróxido de amonio, hidróxido de potasio o hidróxido de sodio. En ciertas realizaciones, la composición de colágeno se incuba en hidróxido de sodio aproximadamente 0,5 M durante un tiempo suficiente para producir una composición de la invención. El tratamiento alcalino se puede repetir de acuerdo con el criterio de los expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, se repite dos veces o más.

En ciertas realizaciones, las etapas del procedimiento se llevan a cabo en cualquier orden. En ciertas realizaciones, al menos una etapa de choque osmótico precede a cualquier tratamiento con detergente o tratamiento en condiciones alcalinas. En ciertas realizaciones, al menos una etapa de choque osmótico precede a un tratamiento con detergente que está seguido de un tratamiento alcalino.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición para su uso en métodos para aumentar o sustituir el tejido de un mamífero mediante la administración de una composición de colágeno de la invención a un mamífero que lo necesite. En ciertas realizaciones, el mamífero es un ser humano. La composición de colágeno se puede administrar de acuerdo con cualquier mecanismo conocido por los expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, las composiciones de colágeno se van a administrar mediante inyectable. En ciertas realizaciones, las propiedades reológicas de las composiciones de colágeno de la invención son ventajosas. En ciertas realizaciones, la composición de colágeno se puede utilizar como una matriz extracelular de acuerdo con los métodos descritos en la Publicación de Patente de los Estados Unidos Núm. 2004/0048796.

El documento WO03/082201 describe un biotejido de colágeno de colágeno telopeptídico obtenido a partir de una placenta que implica el tratamiento con un detergente tal como ácido desoxicólico. Se describe que el biotejido de colágeno tiene características biomecánicas deseables útiles en aplicaciones de injerto de tejido. Sin embargo, el documento WO03082201 no menciona nada sobre el tratamiento de colágeno telopeptídico placentario con un álcali.

En otro aspecto, la presente invención proporciona kits para su uso en la administración de las composiciones de colágeno de la invención a un mamífero que lo necesite. Los kits comprenden típicamente una composición de colágeno de la invención en un envase conveniente para su distribución a un profesional experto en la técnica. Los kits pueden comprender adicionalmente medios para su uso en la administración de la composición de colágeno de la invención al mamífero. Los medios pueden ser cualquier medio para la administración de una composición de colágeno conocido por los expertos en la técnica, tal como una jeringa, una jeringa y una aguja, una cánula, etc. En ciertas realizaciones, el medio se carga previamente con una composición de colágeno de la invención.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición para su uso en un método de promoción de la cicatrización de una herida que comprende poner en contacto la herida con una composición de colágeno de la invención, en donde dicho contacto da como resultado una mejora detectablemente mayor de un aspecto de la herida en comparación con una herida que no se pone en contacto con la composición.

En otra realización específica, dicha herida es una úlcera en la pierna. La úlcera en la pierna puede ser una úlcera venosa en la pierna, una úlcera arterial en la pierna, una úlcera diabética en la pierna o una úlcera de decúbito en la pierna. En otra realización específica, dicha composición se utiliza como relleno de la herida.

Como se describe anteriormente y en detalle en las siguientes secciones, las composiciones, procedimientos, usos y kits de la invención tienen utilidad para la administración de composiciones de colágeno a mamíferos que lo necesiten.

5. Breve descripción de las figuras

FIG. 1: Representación mediante diagrama de flujo de los métodos para el aislamiento de la matriz extracelular (MEC).

FIG. 2A: Secreción de IL-6 a partir de células madre de placenta cultivadas en una composición de colágeno elaborada mediante diferentes métodos. Abscisa: condiciones de crecimiento específicas por tipo de composición y tiempo de crecimiento de las células en la composición. Ordenada: picogramos por mililitro por cada 1000 células unidas a MEC. NC = sin células. Purecol = colágeno purificado. TCPS = poliestireno de cultivo tisular.

FIG. 2B: Secreción de IL-8 a partir de células madre de placenta cultivadas en una composición de colágeno elaborada mediante diferentes métodos. Abscisa: condiciones de crecimiento específicas por tipo de composición y tiempo de crecimiento de las células en la composición. Ordenada: picogramos por mililitro por cada 1000 células unidas a MEC. NC = sin células. Purecol = colágeno purificado. TCPS = poliestireno de cultivo tisular.

5 FIG. 2C: Secreción de MCP-1 a partir de células madre de placenta cultivadas en una composición de colágeno elaborada mediante diferentes métodos. Abscisa: condiciones de crecimiento específicas por tipo de composición y tiempo de crecimiento de las células en la composición. Ordenada: picogramos por mililitro por cada 1000 células unidas a MEC. NC = sin células. Purecol = colágeno purificado. TCPS = poliestireno de cultivo tisular.

6. Descripción detallada de la invención

10 6.1 Definiciones

Según se utiliza en la presente memoria, los siguientes términos tendrán los siguientes significados:

El término "colágeno" se refiere a cualquier colágeno conocido por los expertos en la técnica.

El término "colágeno telopeptídico" se refiere a una forma de colágeno, reconocida por los expertos en la técnica, que comprende una o más regiones telopeptídicas.

15 El término "colágeno atelopeptídico" se refiere a una forma de colágeno, reconocida por los expertos en la técnica, que carece de una o más regiones telopeptídicas. En ciertas realizaciones, la región telopeptídica puede ser eliminada mediante digestión con proteasas como se comenta en detalle a continuación.

"Biocompatibilidad" o "biocompatible", según se utiliza en la presente memoria se refiere a la propiedad de ser biológicamente compatible al no producir una respuesta tóxica, perjudicial, o inmunológica o rechazo en el tejido vivo. La respuesta corporal a sustancias desconocida es una de las principales preocupaciones cuando se utilizan materiales artificiales en el organismo y por lo tanto la biocompatibilidad de un material es una consideración de diseño importante en tales materiales.

20 "Apirógeno" según se utiliza en la presente memoria, se refiere a un material ha sido sometido a ensayo y se ha encontrado que contienen menos de o igual a 0,5 UE/mL de un pirógeno, p. ej., endotoxina. Una UE es aproximadamente de 0,1 a 0,2 ng de endotoxina por mililitro y varía de acuerdo con la referencia consultada.

25 El término "sujeto" se refiere a animales tales como mamíferos, incluyendo, pero no limitados a, primates (p. ej., seres humanos), vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, conejos, ratas, ratones y similares. En ciertas realizaciones, el sujeto es un ser humano.

6.2 Realizaciones de la invención

30 La presente invención se refiere a composiciones de colágeno de acuerdo con la reivindicación 1, a los procedimientos para la preparación de las composiciones de colágeno, a los kits que comprenden las composiciones de colágeno y sus métodos de uso.

6.2.1. Composiciones de colágeno de la invención

35 En una realización, la presente invención proporciona composiciones de colágeno útiles, por ejemplo, para aumentar o reemplazar tejido de un mamífero. En ciertas realizaciones, las composiciones de colágeno de la invención tienen propiedades de durabilidad, inyectabilidad y reológicas ventajosas. En otras ciertas realizaciones, la invención proporciona composiciones de colágeno que poseen propiedades de relleno del espacio y, p. ej., facilitan y apoyan el crecimiento de la vasculatura en un tejido en contacto con la composición. En otras ciertas realizaciones, la composición de la invención se seca al aire o se liofiliza, y se moldea en una configuración útil. En otras ciertas realizaciones, la composición de la invención es insoluble en agua.

40 En este aspecto de la invención, el colágeno puede ser cualquier colágeno conocido por los expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, el colágeno es colágeno de mamífero. En realizaciones concretas, el colágeno es colágeno humano, bovino, ovino, de oveja, rata o canguro. En ciertas realizaciones no de mamífero, el colágeno es colágeno de pescado. Aunque el colágeno puede ser de cualquiera de estas fuentes, el colágeno humano es un ejemplo concreto.

45 El colágeno es colágeno de placenta, por ejemplo colágeno placentario bovino, colágeno placentario ovino o colágeno placentario humano. Un ejemplo es el colágeno placentario humano.

50 El colágeno puede ser cualquier tipo de colágeno conocido por los expertos en la técnica o una mezcla de tales colágenos. En ciertas realizaciones, el colágeno se encuentra en forma de una composición de colágeno que comprende uno o más tipos de colágeno. Los colágenos concretos incluyen colágeno tipo I, colágeno tipo II, colágeno tipo III y colágeno tipo IV. En ciertas realizaciones, la composición de colágeno de la invención comprende cantidades concretas de estos colágenos. Una composición concreta comprende una cantidad sustancial de

colágeno de tipo I, mientras que también está enriquecida en colágeno de tipo IV. En ciertas realizaciones, una composición de colágeno de la invención comprende entre 1 y 15% de colágeno tipo IV, entre 2 y 13% de colágeno tipo IV, entre 3 y 12% de colágeno tipo IV o entre 4 y 11% de colágeno tipo IV. Al mismo tiempo, la composición de colágeno puede comprender al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, o al menos 99% de colágeno tipo I. Por ejemplo, la composición puede comprender entre 70 y 95% de colágeno tipo I, entre 74 y 92% de colágeno tipo I o entre 80 y 90% de colágeno tipo I. Las mismas composiciones de colágeno de la invención pueden comprender una cantidad de colágeno tipo III, por ejemplo, hasta 1%, hasta 2%, hasta 3%, hasta 4%, hasta 5%, hasta 6% o hasta 7% de colágeno de tipo III. En ciertas realizaciones, las composiciones de colágeno de la invención comprenden entre 2 y 15% de colágeno tipo IV, entre 70 y 95% de colágeno tipo I y hasta 6% de colágeno tipo III.

En ciertas realizaciones, la composición de colágeno comprende una o más proteínas o componentes de la matriz extracelular además de colágeno. En realizaciones específicas, la composición de colágeno comprende fibronectina, laminina, elastina y/o glicosaminoglicanos. En otra realización específica, la composición de colágeno comprende fibronectina no detectable, o laminina no detectable. En otra realización específica, la composición de colágeno comprende aproximadamente 5% o más de elastina en peso seco. En otra realización específica, la composición de colágeno comprende aproximadamente 10% o más de elastina en peso seco. En otra realización específica, la composición de colágeno comprende no más de aproximadamente 5% de elastina en peso seco.

Estas composiciones de colágeno de la invención se pueden obtener mediante un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8. Los procesos concretos se describen en detalle en las secciones de más abajo.

En ciertas realizaciones, las composiciones de colágeno de este aspecto de la invención están entrecruzadas. En ciertas realizaciones, las composiciones de colágeno pueden ser entrecruzadas con un agente de entrecruzamiento tal como glutaraldehído de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica. Tales métodos se describen extensamente, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.852.640, 5.428.022, 5.660.692 y 5.008.116, y en McPherson et al., 1986, J. Biomedical Materials Res. 20: 79-92.

Otros ejemplos de agentes de entrecruzamiento ilustrativos y de métodos para su uso para el entrecruzamiento de colágeno se describen en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.880.242 y 6.117.979 y en Zeeman et al., 2000, J Biomed Mater Res. 51(4): 541-8, van Wachem et al., 2000, J Biomed Mater Res. 53(1): 18-27, van Wachem et al., 1999, J Biomed Mater Res. 47(2): 270-7, Zeeman et al., 1999, J Biomed Mater Res. 46(3): 424-33, Zeeman et al, 1999, Biomaterials 20(10): 921-31.

En otras realizaciones las composiciones de colágeno de la invención están entrecruzadas con diglicidil éter de 1,4-butanodiol. En otras realizaciones las composiciones de colágeno de la invención están entrecruzadas con genipina. La genipina es un agente de entrecruzamiento de origen natural no tóxico. Se puede obtener a partir de su compuesto parental, genipósido, que se puede aislar a partir de los frutos de *Gardenia jasminoides*. La genipina se puede obtener comercialmente de Challege Bioproducts Co., Ltd., 7 Alley 25, Lane 63, TzuChiang St. 404 Taichung Taiwan ROC, Tel 886-4-3600852. El uso de genipina como reactivo de entrecruzamiento se describe ampliamente en la Publicación de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Núm. 20030049301.

En otras realizaciones, la composición de colágeno puede ser entrecruzada con otros agentes de entrecruzamiento conocidos por los expertos en la técnica. En realizaciones adicionales, la composición de colágeno puede ser entrecruzada con cualquier mecanismo de entrecruzamiento mediado por enzimas conocido para los expertos en la técnica. Por ejemplo, la composición de colágeno de la invención puede ser entrecruzada por medio de transglutaminasa de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica. La transglutaminasa cataliza la formación del entrecruzamiento de amida entre los residuos de glutamina y lisina del colágeno. Tales métodos se describen, por ejemplo, en Orban et al., 2004, J. Biomedical Materials Res. 68(4): 756-62.

Las composiciones de colágeno de la invención pueden ser entrecruzadas con un solo agente de entrecruzamiento o con una mezcla de agentes de entrecruzamiento. En ciertas realizaciones, la composición de colágeno de la invención comprende colágeno placentario humano tratado con álcali, tratado con detergente entrecruzado con glutaraldehído.

6.3 Procedimientos para la preparación de composiciones de colágeno de la invención

En otro aspecto, la presente invención proporciona procedimientos para preparar las composiciones de colágeno de la invención. Los procedimientos son útiles, por ejemplo, para preparar las composiciones de colágeno de la invención descritas anteriormente.

En ciertas realizaciones, las composiciones de colágeno de la invención se preparan a partir de placenta humana de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria. Las etapas iniciales de preparación de las composiciones de colágeno de placenta humana se describen en detalle en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.428.022, 5.660.692 y 5.008.116, y en las Publicaciones de Solicitud de Patente de los Estados Unidos Núms. 20040048796 y 20030187515.

El tejido placentario puede ser de cualquier parte de la placenta incluyendo el amnios, ya sea soluble o insoluble o

ambos, el corion, el cordón umbilical o la placenta completa. En ciertas realizaciones, la composición de colágeno se prepara a partir de placenta humana completa sin cordón umbilical.

El saco de la placenta se compone de dos capas íntimamente conectada por tejido conectivo laxo. Se conocen como capas amniótica y coriónica. La capa amniótica es la más interna de las dos capas y entra en contacto con el fluido amniótico que rodea el feto y juntos forman el saco amniótico. La capa amniótica es avascular y está revestida de epitelio cilíndrico simple que recubre una membrana basal y mide 30-60 micras de espesor. La membrana coriónica es la capa exterior del saco y está en gran medida celularizada. El árbol vascular se origina en la placenta y se extiende a las membranas de la placenta a través de la capa coriónica. La capa coriónica está separada de la capa amniótica por tejido conectivo laxo y combinada, las dos capas miden 120-180 micras. Las membranas de la placenta tienen una matriz de colágeno que está muy cargada de mucopolisacáridos y se cree que sirven principalmente como un saco protector para el feto en desarrollo. Las membranas también mantienen una barrera para agentes infecciosos e inmunológicos presentes en la circulación materna. Las membranas de la placenta tienen transporte tanto activo como pasivo. La mayoría de las moléculas pequeñas y proteínas pueden viajar libremente a través de ellas, pero las grandes proteínas tales como la IgM no pueden cruzar a través de la capa basal.

En una realización concreta, la placenta para su uso en los métodos de la invención se recoge tan pronto como sea posible después del parto de un recién nacido. En otra realización concreta más, la placenta se recoge inmediatamente después del parto por cesárea de un bebé normal y saludable. Ventajosamente, la placenta se puede recoger en condiciones asépticas. En algunas realizaciones, la placenta se almacena durante 48 horas a partir del momento del parto antes de cualquier tratamiento adicional. En otras realizaciones, la placenta se almacena durante un máximo de 5 días a partir del momento del parto antes de cualquier tratamiento adicional.

Ventajosamente, la placenta, el cordón umbilical y la sangre del cordón umbilical se pueden transportar desde la sala de parto o alumbramiento a otro lugar, p. ej., un laboratorio, para su procesamiento adicional. La placenta puede ser transportada en un dispositivo de transporte estéril tal como una bolsa estéril o en un contenedor, que está opcionalmente aislado térmicamente. En algunas realizaciones, la placenta se almacena a temperatura ambiente hasta el tratamiento adicional. En otras realizaciones, la placenta se refrigera hasta el tratamiento adicional, es decir, se almacena a una temperatura de aproximadamente 2° a 8°C. En otras realizaciones, la placenta se almacena en condiciones estériles durante hasta 5 días antes de su tratamiento adicional. En una realización concreta, la placenta se manipula y se procesa en condiciones asépticas, como es conocido para los expertos en la técnica. El laboratorio puede estar equipado con un sistema de filtración HEPA (definida por la clasificación de salas limpias, por tener una clase 1000 o mejor). En una realización particular, el sistema de filtración HEPA se enciende al menos 1 hora antes de usar la sala de laboratorio para llevar a cabo los métodos de la invención.

En ciertas realizaciones, la placenta se exanguina, es decir, se drena completamente de la sangre del cordón que queda después del nacimiento. En algunas realizaciones, la placenta se exanguina al 70%, se exanguina al 80%, se exanguina al 90%, se exanguina al 95%, o se exanguina al 99%.

La invención incluye el escrutinio de la mujer embarazada antes de la hora del nacimiento, utilizando mecanismos convencionales conocidos por los expertos en la técnica, para determinar enfermedades transmisibles, que incluyen, pero no se limitan a, VIH, VHB, VHC, HTLV, sífilis, CMV, y otros patógenos virales que se sabe que contaminan el tejido placentario. Ventajosamente, los métodos se pueden utilizar para escrutar una enfermedad contagiosa siguiendo las regulaciones expuestas por la Administración Federal de Fármacos. La futura madre puede ser escrutada (p. ej., se toma una muestra de sangre con fines diagnósticos) en el plazo de un mes desde el nacimiento, concretamente en el plazo de dos semanas desde el nacimiento, concretamente en el plazo de una semana desde el nacimiento, o en el momento del nacimiento. Solamente los tejidos recogidos de donantes cuyas madres dieron negativo o no reactivo a los patógenos mencionados anteriormente se utilizan para producir una composición de colágeno de la invención. Ventajosamente, se pueden obtener una historia paterna, y médica y social completa del donante de la membrana placentaria, incluyendo, por ejemplo, un historial familiar detallado.

En ciertas realizaciones, el donante se escruta utilizando ensayos serológicos y bacteriológicos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. Cualquier análisis o ensayo diagnóstico que identifica el patógeno o los patógenos se encuentra dentro del alcance del método de la invención, pero los análisis concretos son aquellos que combinan una elevada exactitud con capacidad de alto rendimiento. En una realización específica, la invención incluye el escrutinio del donante utilizando mecanismos convencionales conocidos por los expertos en la técnica para determinar antígenos y/o anticuerpos. Un ejemplo no limitante de antígenos y anticuerpos incluyen: escrutinio de anticuerpos (ATY); escrutinio de alanina amino transferasa (ALT); Anticuerpo del Núcleo de la Hepatitis (ácido nucleico y ELISA); Antígeno de Superficie de la Hepatitis B; Anticuerpo del Virus de la Hepatitis C; VIH-1 y VIH-2; HTLV-1 y HTLV-2; ensayo de Sífilis (RPR); ensayo de anticuerpos de CMV; y ensayo de Hepatitis C y de VIH. Los análisis utilizados pueden ser análisis basados en ácidos nucleicos o análisis basados en ELISA conocidos por los expertos en la técnica.

La invención incluye ensayos adicionales de sangre del cordón umbilical del recién nacido utilizando mecanismos convencionales conocidos por los expertos en la técnica (véase, p. ej., Cotorruelo et al., 2002, *Clin. Lab.* 48(5 6): 271 81; Maine et al., 2001, *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 1(1):19 29; Nielsen et al., 1987, *J. Clin. Microbiol.* 25(8): 1406 10; todas las cuales se incorporan a la presente memoria como referencia en su totalidad). En una realización, la sangre

de cordón umbilical del recién nacido se somete a ensayo para determinar patógenos bacterianos (incluyendo bacterias gram positivas y gram negativas) y hongos utilizando mecanismos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. En una realización específica, el tipo de sangre y el factor Rh de la sangre del cordón umbilical del recién nacido se determinan utilizando mecanismos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. En otra realización, se obtiene un CBC con diferencial de la sangre del cordón umbilical del recién nacido utilizando métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. En otra realización más, se recoge de la sangre del cordón umbilical del recién nacido un cultivo bacteriano aeróbico, utilizando métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. Solamente se utilizan los tejidos recogidos de donantes que tienen un CBC en un límite normal (p. ej., ninguna anomalía o desviación grosera del nivel normal), una prueba negativa para la serología y bacteriología, y una prueba negativa o no reactiva para enfermedades infecciosas y contaminación para producir una composición de colágeno de la invención.

Una vez que se obtiene el tejido de la placenta humana, éste puede ser tratado de acuerdo con las siguientes etapas con el fin de preparar una composición de colágeno de la invención. Aunque las siguientes etapas se presentan en orden sucesivo, un experto en la técnica reconocerá que el orden de varias etapas puede ser intercambiado sin exceder el alcance de la invención. Además, varias etapas se indican como opcionales, dependiendo de la naturaleza de la composición de colágeno deseada de la invención. Se supone que las técnicas fácilmente evidentes para los expertos en la técnica tales como el intercambio de tampón, la precipitación, la centrifugación, la resuspensión, la dilución y la concentración de las composiciones de proteínas no necesitan ser explicadas en detalle. En los ejemplos siguientes se describe una preparación ilustrativa.

Cualquier porción de la placenta, o la placenta completa, se pueden utilizar en los procedimientos de la presente invención. En ciertas realizaciones, las composiciones de colágeno se preparan a partir de placenta completa. Sin embargo, en ciertas realizaciones, las composiciones de colágeno se pueden obtener a partir de porciones coriónicas o amnióticas de la placenta.

En estas realizaciones, la invención incluye el procesamiento de la membrana placentaria de modo que el cordón umbilical se separa del disco placentario, y la separación de la membrana amniótica de la membrana coriónica. En una realización concreta, la membrana amniótica se separa de la membrana coriónica antes de cortar la membrana placentaria. La separación de la membrana amniótica de la membrana coriónica se puede realizar partiendo del borde de la membrana placentaria. En otra realización, la membrana amniótica se separa de la membrana coriónica utilizando disección roma, p. ej., con dedos enguantados. Después de la separación de la membrana amniótica de la membrana coriónica y el disco placentario, el muñón del cordón umbilical se corta, p. ej., con unas tijeras, y se separa del disco placentario. En ciertas realizaciones, cuando la separación de las membranas amnióticas y coriónicas no es posible sin desgarrar el tejido, la invención abarca el corte de las membranas amniótica y coriónica del disco de la placenta en una sola pieza y después su separación.

La membrana amniótica, la membrana coriónica o la placenta completa se pueden almacenar antes de su uso en los procedimientos de la invención. Los mecanismos de almacenamiento serán evidentes para los expertos en la técnica. Los mecanismos de almacenamiento ilustrativos se describen con detalle en las Publicaciones de Solicitud de Patente de los Estados Unidos Núms. 20040048796 y 20030187515.

En algunos procedimientos de la invención, el tejido de la placenta se descelulariza. El tejido de la placenta se puede descelularizar de acuerdo con cualquier mecanismo conocido por los expertos en la técnica tales como los descritos en detalle en Publicaciones de Solicitud de Patente de los Estados Unidos Núms. 20040048796 y 20030187515.

En ciertas realizaciones, el tejido de la placenta se somete a un choque osmótico. La etapa de choque osmótico puede producir composiciones de colágeno de la invención con una pureza ventajosa. Aunque no se pretende estar vinculado a ninguna teoría concreta de funcionamiento, se cree que el choque osmótico puede reventar las células en el tejido y facilitar de este modo la eliminación de las células, componentes celulares y componentes de la sangre. El choque osmótico puede ser adicional a cualquier etapa de aclarado o puede ser la única etapa de aclarado de acuerdo con el criterio de un experto en la técnica.

El choque osmótico se puede llevar a cabo en cualquier condición de choque osmótico conocidas por los expertos en la técnica. Tales condiciones incluyen la incubación del tejido en soluciones de alto potencial osmótico, o de bajo potencial osmótico o de potencial osmótico alternante alto y bajo. La disolución de alto potencial osmótico puede ser cualquier disolución de alto potencial osmótico conocida por los expertos en la técnica, tal como una disolución que comprende uno o más de NaCl (p. ej., 0,2 a 1,0 M), KCl (p. ej., 0,2 - 1,0 o 2,0 M), sulfato de amonio, un monosacárido, un disacárido (p. ej., sacarosa al 20%), un polímero hidrófilo (p. ej., polietilenglicol), glicerol, etc. En ciertas realizaciones, la disolución de alto potencial osmótico es una disolución de cloruro de sodio. En algunas realizaciones, la disolución de cloruro de sodio es NaCl al menos 0,25 M, 0,5 M, 0,75 M, 1,0 M, 1,25 M, 1,5 M, 1,75 M, 2 M, o 2,5 M. En algunas realizaciones, la disolución de cloruro de sodio es NaCl aproximadamente 0,25-5 M, aproximadamente 0,5-4 M, aproximadamente 0,75-3 M, o aproximadamente 1,0-2,0 M.

La disolución de bajo potencial osmótico puede ser cualquier disolución de bajo potencial osmótico conocida por los expertos en la técnica, tal como agua, por ejemplo agua desionizada de acuerdo con cualquier método conocido por los expertos. En algunas realizaciones, la disolución de choque osmótico comprende agua con un potencial de

choque osmótico menor del de NaCl 50 mM.

En ciertas realizaciones, el choque osmótico está en una disolución de cloruro de sodio seguida de disolución de agua. En algunas realizaciones, la disolución de cloruro de sodio es NaCl al menos 0,5 M. En ciertas realizaciones, la disolución de cloruro de sodio es NaCl al menos 0,75 M. En algunas realizaciones, la disolución de cloruro de sodio es NaCl al menos 1,0 M. En algunas realizaciones, la disolución de cloruro de sodio es NaCl al menos 1,5 M. En algunas realizaciones, la disolución de cloruro de sodio es NaCl al menos 2,0 M. En ciertas realizaciones, un tratamiento con NaCl 0,5 M está seguido de lavado con agua. En ciertas realizaciones, dos tratamientos con NaCl 0,5 M están seguidos de un lavado con agua. En ciertas realizaciones, un tratamiento con NaCl 2M está seguido de un lavado con agua. Estas secuencias se pueden repetir de acuerdo con el criterio de un experto en la técnica.

En ciertas realizaciones, la composición de colágeno resultante del choque osmótico se puede incubar con un detergente. Aunque no se pretende estar vinculado a ninguna teoría concreta de funcionamiento, se cree que un detergente puede romper las células, las membranas celulares, las membranas subcelulares y los restos celulares que podrían estar presentes en la composición. El detergente puede ser cualquier detergente conocido por los expertos en la técnica que sea capaz de romper membranas celulares o subcelulares. En ciertas realizaciones, el detergente es iónico. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el detergente es desoxicolato o dodecilsulfato de sodio. En los ejemplos de trabajo de más abajo, un tratamiento con detergente ilustrativo es con ácido desoxicólico. En ciertas realizaciones, el detergente es zwitteriónico. En ciertas realizaciones, el detergente es no iónico. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el detergente puede ser un detergente TWEEN[®], tal como TWEEN-20[®], o un detergente Triton X, tal como Triton X 100. La composición de colágeno se debe poner en contacto con el detergente en las condiciones consideradas por un experto en la técnica como adecuadas para eliminar los componentes no deseados de la composición. Las condiciones ilustrativas se proporcionan en los siguientes ejemplos de trabajo.

El tratamiento con detergente se puede llevar a cabo a cualquier temperatura de acuerdo con el criterio de los expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, el tratamiento con detergente se lleva a cabo a aproximadamente 0-30°C, aproximadamente 5-25°C, aproximadamente 5-20°C, o aproximadamente 5°-15°C. En ciertas realizaciones, el tratamiento con detergente se lleva a cabo a aproximadamente 0°C, aproximadamente 5°C, aproximadamente 10°C, aproximadamente 15°C, aproximadamente 20°C, aproximadamente 25°C, o aproximadamente 30°C. En realizaciones concretas, el tratamiento con detergente se lleva a cabo a aproximadamente 5-15°C.

El tratamiento con detergente se puede realizar durante un tiempo adecuado de acuerdo con el criterio de los expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, el tratamiento con detergente se puede llevar a cabo durante aproximadamente 1-24 horas, aproximadamente 2-20 horas, aproximadamente 5-15 horas, aproximadamente 8-12 horas, o aproximadamente 2-5 horas.

En ciertas realizaciones, la composición de colágeno resultante del tratamiento de detergente se puede incubar en condiciones alcalinas. Aunque no se pretende estar vinculado a ninguna teoría concreta de funcionamiento, se cree que un tratamiento alcalino puede eliminar las partículas virales que podrían contaminar la composición de colágeno. En ciertas realizaciones, el lavado alcalino actúa para eliminar las endotoxinas. Las condiciones alcalinas pueden ser cualquiera de las condiciones alcalinas conocidas por los expertos en la técnica. En particular, se puede utilizar cualquier base a cualquier pH conocido para eliminar las partículas virales. Las bases concretas para el tratamiento alcalino incluyen bases biocompatibles, bases volátiles y bases conocidas por los expertos en la técnica que se van a retirar con facilidad y seguridad de la composición de colágeno. La base puede ser cualquiera de las bases orgánicas o inorgánicas conocidas por los expertos en la técnica a una concentración, por ejemplo, de 0,2-1,0 M. En ciertas realizaciones, la base se selecciona del grupo que consiste en hidróxido de amonio, hidróxido de potasio e hidróxido de sodio. En ciertas realizaciones, el tratamiento con la base se lleva a cabo en una disolución de hidróxido de sodio. La disolución de hidróxido de sodio puede ser NaOH 0,1 M, NaOH 0,25 M, NaOH 0,5 M, o NaOH 1M. En realizaciones concretas, el tratamiento alcalino se lleva a cabo en NaOH 0,1 M o 0,5 M.

El tratamiento alcalino se puede llevar a cabo a cualquier temperatura de acuerdo con el criterio de los expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, el tratamiento alcalino se lleva a cabo a aproximadamente 0-30°C, aproximadamente 5-25°C, aproximadamente 5-20°C, o aproximadamente 5°-15°C. En ciertas realizaciones, el tratamiento alcalino se lleva a cabo a aproximadamente 0°C, aproximadamente 5°C, aproximadamente 10°C, aproximadamente 15°C, aproximadamente 20°C, aproximadamente 25°C, o aproximadamente 30°C. En realizaciones concretas, el tratamiento alcalino se lleva a cabo a aproximadamente 5-15°C.

El tratamiento alcalino se puede llevar a cabo durante un tiempo adecuado de acuerdo con el criterio de los expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, el tratamiento alcalino se puede llevar a cabo durante aproximadamente 1-24 horas, aproximadamente 2-20 horas, aproximadamente 5-15 horas, aproximadamente 8-12 horas, o aproximadamente 2-5 horas.

Las variaciones de las etapas de lavado con detergente y NaOH se pueden utilizar para generar numerosas variaciones del material MEC final. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el tejido que contiene colágeno se puede tratar con NaOH aproximadamente 0,1 M, 0,2 M, 0,3 M, 0,4 M, o aproximadamente 0,5 M durante aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, o aproximadamente 24 horas.

En otras ciertas realizaciones, la composición de colágeno de la invención se produce sin tratamiento con álcali. Cuando el procedimiento se aplica al tejido de la placenta, la omisión de una etapa de tratamiento con álcali típicamente da como resultado una composición de colágeno que comprende cantidades relativamente superiores de elastina, fibronectina y/o laminina que la composición de colágeno producida con la inclusión del tratamiento alcalino.

En ciertas realizaciones, la composición de colágeno se puede secar. El secado facilita el almacenamiento y el envasado de la composición de colágeno. El secado también hace que los componentes celulares sean más susceptibles de ser eliminados de la composición. Adicionalmente, después de cualquiera de las etapas anteriores, la composición de colágeno se puede secar antes de la etapa siguiente. El secado se puede llevar a cabo de acuerdo a cualquier mecanismo de secado evidentes para los expertos en la técnica. Los mecanismos de secado útiles se describen en la Publicación de Patente de los Estados Unidos Núm. 2004/0048796. Los mecanismos de secado ilustrativos incluyen liofilización, secado a vacío, secado por congelación con calor (p. ej., por debajo de aproximadamente 50°C), como se demuestra en los ejemplos de trabajo siguientes.

En ciertas realizaciones, cualquiera de las etapas anteriores se puede llevar a cabo en condiciones estériles. En realizaciones concretas, el tratamiento alcalino, y todas las etapas posteriores, se llevan a cabo en condiciones estériles. En realizaciones adicionales, cualquier composición de colágeno preparada de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria se puede esterilizar adicionalmente de acuerdo con mecanismos evidentes para los expertos en la técnica.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona procedimientos que comprenden las etapas de choque osmótico, secado por congelación, tratamiento con detergente, lavado con agua, secado por congelación, tratamiento alcalino, lavado con agua y secado por congelación descritas anteriormente. En ciertas realizaciones, estas etapas se llevan a cabo en orden. En ciertas realizaciones, el detergente es desoxicolato al 1%. En ciertas realizaciones, el tratamiento alcalino es NaOH 0,5 N durante cuatro horas. En ciertas realizaciones, se repite el primer lavado con agua (dos lavados en total). En ciertas realizaciones, se repite dos veces el segundo lavado con agua (tres lavados en total). En ciertas realizaciones, el detergente es desoxicolato al 1%, el tratamiento alcalino es NaOH 0,5 N durante cuatro horas, se repite el primer lavado con agua (dos lavados en total) y se repite dos veces el segundo lavado con agua (tres lavados en total). En ciertas realizaciones, tal procedimiento puede proporcionar una composición que comprende aproximadamente 0,59% de glicosaminoglicanos, aproximadamente 3,5% de elastina, poca o ninguna fibronectina y poca o ninguna laminina.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona procedimientos que comprenden las etapas de choque osmótico, tratamiento alcalino y lavado con agua descritos anteriormente. En ciertas realizaciones, estas etapas se llevan a cabo en orden. En ciertas realizaciones, el tratamiento alcalino es NaOH 0,5 N durante cuatro horas. En ciertas realizaciones, tal procedimiento puede proporcionar una composición que comprende de aproximadamente 0,28% a aproximadamente 0,38% de glicosaminoglicanos, de aproximadamente 3,2% a aproximadamente 4,7% de elastina, poca o ninguna fibronectina y poca o ninguna laminina.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona procedimientos que comprenden las etapas de choque osmótico, tratamiento con detergente y lavado con agua descritas anteriormente. En ciertas realizaciones, estas etapas se llevan a cabo en orden. En ciertas realizaciones, el detergente es desoxicolato al 1%. En ciertas realizaciones, tal procedimiento puede proporcionar una composición que comprende aproximadamente 0,4% de glicosaminoglicanos, aproximadamente 12% de elastina, aproximadamente 0,6% de fibronectina y aproximadamente 0,16% de laminina.

6.3.1. Tratamiento adicional opcional

En ciertas realizaciones, una composición de colágeno de la invención se puede utilizada como fuente para una composición de colágeno ateloapéptido. La composición de colágeno ateloapéptido se puede utilizar para cualquier propósito evidente para los expertos en la técnica para el colágeno ateloapéptido.

En tales realizaciones, la composición de colágeno se puede poner en contacto con una enzima capaz de eliminar parcialmente o completamente los telopéptidos del colágeno. La enzima puede ser cualquier enzima proteolítica conocida por los expertos en la técnica que sea capaz de eliminar telopéptidos del colágeno. En ciertas realizaciones, la enzima es la pepsina o la papaína. Generalmente, la enzima se pone en contacto con la composición de colágeno en condiciones adecuadas para la eliminación de telopéptidos conocidas por los expertos en la técnica.

Los métodos de tratamiento de las composiciones de colágeno con enzimas para eliminar telopéptidos se describen con detalle en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.511.653, 4.582.640, 5.436.135 y 6.548.077. Generalmente, la enzima se pone en contacto con la composición de colágeno en condiciones adecuadas para la eliminación de telopéptidos conocidas por los expertos en la técnica. Tales condiciones incluyen, por ejemplo, poner en contacto la enzima con la composición de colágeno a un pH adecuado, a una concentración de enzima adecuada, en un volumen adecuado de una disolución, a una temperatura adecuada y durante un tiempo adecuado.

La composición de colágeno se puede poner en contacto con la enzima en condiciones de pH bajo de acuerdo con

el criterio de los expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, la composición de colágeno se pone en contacto con pepsina a pH de aproximadamente 1-3 o aproximadamente 2-3.

En ciertas realizaciones, la enzima se pone en contacto con la composición de colágeno a temperatura elevada. Aunque no se pretende estar vinculado a ninguna teoría concreta de funcionamiento, se cree que la temperatura elevada puede mejorar el rendimiento del colágeno de tipo I en la composición de colágeno final. En ciertas realizaciones, la composición de colágeno se pone en contacto con pepsina a aproximadamente 15-40°C, aproximadamente 20-35°C, aproximadamente 25-30°C, aproximadamente 20-30°C, o aproximadamente 23-27°C. En realizaciones concretas, la composición de colágeno se pone en contacto con pepsina a aproximadamente 23-27°C durante un tiempo suficiente para eliminar telopéptido.

10 La composición de colágeno se pone en contacto con la enzima durante un tiempo suficiente para eliminar telopéptidos de acuerdo con el criterio de los expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, el colágeno se pone en contacto con pepsina durante al menos 5, 10, 15, 20, 25 o 30 horas. En ciertas realizaciones, se pone en contacto con pepsina durante aproximadamente 5-30 horas, aproximadamente 10-25 horas o aproximadamente 20-25 horas. En ciertas realizaciones, se pone en contacto con pepsina durante aproximadamente 8, 16, 24 o 32 horas.

15 La composición de colágeno se pone en contacto con la enzima en una cantidad adecuada para eliminar telopéptidos de acuerdo con el criterio de los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, se ponen en contacto aproximadamente 0,1 g, 0,5 g, 1,0 g, 2,0 g o 5,0 g de pepsina/kg de placenta congelada con la composición de colágeno. En ciertas realizaciones, se ponen en contacto aproximadamente 0,1 g, 0,5 g, 1,0 g, 2,0 g o 5,0 g de pepsina/placenta con la composición de colágeno. En ciertas realizaciones, la composición de colágeno se pone en contacto con aproximadamente 0,1-10,0 g/L, aproximadamente 0,5-5/L, aproximadamente 1-2,5 g/L, o aproximadamente 0,5-1,5 g/L de pepsina. En algunas realizaciones, la composición de colágeno se pone en contacto con aproximadamente 0,1 g/L, aproximadamente 0,2 g/L, aproximadamente 0,5 g/L, aproximadamente 1,0 g/L, aproximadamente 2,0 g/L, 5 g/L o 10 g/L de pepsina. En realizaciones concretas, la composición de colágeno se pone en contacto con aproximadamente 0,5-1,0 g/L de pepsina en disolución de ácido acético con un pH de aproximadamente 2-3, a aproximadamente 23°C-27°C durante aproximadamente 16-24 horas.

25 La composición de colágeno se pone en contacto con la enzima en un volumen de disolución adecuada: placenta para eliminar telopéptidos de acuerdo con el criterio de los expertos en la técnica. Se observa que una alta razón en volumen con respecto a la placenta puede maximizar el efecto de la pepsina. En ciertas realizaciones, se utilizan aproximadamente 1, 2, 4, u 8 volúmenes de disolución de ácido acético por placenta. En realizaciones concretas, se utilizan aproximadamente 2 volúmenes de disolución de ácido acético por placenta.

30 Si se desea, las composiciones de colágeno de la invención se pueden procesar adicionalmente por medio de fibrilación. La fibrilación se puede llevar a cabo mediante cualquier mecanismo de fibrilación de colágeno conocido por los expertos en la técnica. La fibrilación de las composiciones de colágeno se describe ampliamente en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.511.653, 4.582.640 y 5.436.135. Si fuera necesario, la composición de colágeno se puede concentrar de acuerdo con técnicas convencionales antes de la fibrilación.

35 Cuando se desee, las composiciones de colágeno de la invención se pueden entrecruzar. En ciertas realizaciones, la composición de colágeno se somete a fibrilación antes del entrecruzamiento. El entrecruzamiento puede ser con cualquier agente de entrecruzamiento conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo, los agentes de entrecruzamiento comentados en la sección anterior. En ciertas realizaciones, el agente de entrecruzamiento puede ser glutaraldehído, y el entrecruzamiento se puede llevar a cabo de acuerdo con los métodos de entrecruzamiento con glutaraldehído del colágeno conocidos por los expertos en la técnica. En otras realizaciones, el agente de entrecruzamiento puede ser diglicidil éter de 1,4-butanodiol o genipina. En realizaciones concretas, el agente de entrecruzamiento es diglicidil éter de 1,4-butanodiol.

40 En algunas realizaciones, se puede reducir un enlace covalente entre un agente de entrecruzamiento y un colágeno, por ejemplo, para mejorar la estabilidad. La reducción se puede lograr poniendo en contacto la composición de colágeno de la invención con cualquier agente reductor conocido por los expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, el agente reductor es borohidruro de sodio, bisulfito de sodio, β -mercaptoetanol, ácido mercaptoacético, mercaptoetilamina, bencilmercaptano, tiocresol, ditiotreitól o una fosfina tal como tributilfosfina. El borohidruro de sodio es un ejemplo útil. En ciertas realizaciones, el colágeno se entrecruza antes de la reducción con el agente reductor. La reducción de composiciones de colágeno y las composiciones de colágeno entrecruzado se describe ampliamente en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.185.011, 4.597.762, 5.412.076 y 5.763.579.

45 En ciertas realizaciones, la composición de colágeno se puede procesar adicionalmente mediante cizallamiento mecánico de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica. Las técnicas de cizallamiento ilustrativas se describen en la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.642.117. En ciertas realizaciones, la composición de colágeno se somete a cizalla con un homogeneizador de tejidos conocido por los expertos en la técnica.

55 En ciertas realizaciones, se pueden adoptar medidas para limitar la actividad de la proteasa en las composiciones de

colágeno de la invención. Aditivos tales como quelantes de iones metálicos, por ejemplo 1,10-fenantrolina y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), crean un entorno desfavorable para muchas enzimas proteolíticas. Proporcionar condiciones subóptimas para proteasas tales como la colagenasa puede ayudar en la protección de las composiciones de colágeno de la degradación. Las condiciones subóptimas para las proteasas se pueden lograr mediante la formulación de las composiciones para eliminar o limitar la cantidad de iones de calcio y de cinc disponibles en la disolución. Muchas proteasas son activas en presencia de iones de calcio y cinc y pierden gran parte de su actividad en entornos libres de iones de calcio y de cinc. Ventajosamente, se preparará una composición de colágeno seleccionando las condiciones de pH, disponibilidad reducida de iones de calcio y de cinc, presencia de quelantes de iones metálicos y uso de inhibidores proteolíticos específicos para colagenasa. Por ejemplo, una composición de colágeno puede incluir una disolución tamponada de agua, pH 5,5 a 8, o pH 7 a 8, libre de iones de calcio y de cinc e incluyendo un quelante de iones metálicos tal como EDTA. Adicionalmente, también se puede emplear el control de los parámetros de temperatura y tiempo durante el tratamiento de una composición de colágeno para limitar la actividad de las proteasas.

6.4 Caracterización de la composición de colágeno

6. 4. 1. Caracterización bioquímica

Los análisis bioquímicos conocidos en la técnica e ilustrados en la presente memoria se pueden utilizar para determinar las composiciones bioquímicas de las composiciones de colágeno de la invención. Los análisis bioquímicos para determinar el contenido total de proteína de una muestra tal como por ejemplo análisis de absorbancia y análisis colorimétricos. Los análisis de absorbancia incluyen análisis que miden la absorbancia a 280 nm (véase, *p. ej.*, Layne, E, Spectrophotometric and Turbidimetric Methods for Measuring Proteins, Methods in Enzymology 3: 447-455, (1957); Stoscheck, CM, Quantitation of Protein, Methods in Enzymology 182:50-69, (1990)), 205 nm y análisis basados en el coeficiente de extinción de la muestra (véanse, *p. ej.*, Scopes, RK, Analytical Biochemistry 59:277, (1974); Stoscheck, CM. Quantitation of Protein, Methods in Enzymology 182:50-69, (1990)). También se describen métodos para determinar el contenido total de proteína específica en las composiciones de colágeno de la invención incluyendo colágeno (*p. ej.*, colágeno tipo I, tipo III, tipo IV), laminina, elastina, fibronectina y glicosaminoglicano.

Los análisis colorimétricos incluyen análisis de Lowry modificado, análisis biuret, análisis de Bradford, análisis de Ácido Bicinconínico (Smith) (véase, *p. ej.*, Stoscheck, CM, Quantitation of Protein, Methods in Enzymology 182:50-69 (1990)).

En una realización específica, se mide el contenido total de proteína de una composición de colágeno de la invención utilizando un análisis de unión a colorante de Bradford (Bradford, M., Analytical Biochemistry, 72, 248 (1976)). Un análisis de Bradford ilustrativo para su uso en los métodos de la invención puede comprender lo siguiente: el análisis se puede llevar a cabo utilizando (análisis de unión a colorante de Bradford disponible de BIO-RAD, Hercules, CA, USA. El análisis de proteínas se basa en el cambio de color del colorante Azul Brillante de Coomassie R-250 en respuesta a diferentes concentraciones de proteína. El análisis implica el desarrollo de una curva de calibración patrón midiendo la absorbancia (a 595 nanómetros) de una serie de patrones de colágeno humano de concentraciones conocidas. La concentración de colágeno en una muestra de ensayo, por ejemplo, una muestra de la membrana amniótica, se determina mediante la referencia a la curva patrón. El análisis se desarrolla en un formato convencional que permite la medición de la concentración de colágeno en el intervalo de 0,2-1,4 mg/mL y en forma de un microanálisis que mide la concentración de proteína hasta 25 µg. Para el análisis patrón, el colágeno disuelto en ácido cítrico 100 mM (pH 2,4) se divide en alícuotas en tubos de microcentrifuga de 1,5 mL a concentraciones de 0,1-1 mg/mL en un volumen total de 0,1 mL. A cada tubo, se le añade 1 mL de colorante azul de Coomassie. Las muestras se someten a vórtice y se dejan reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos. La absorbancia se mide a 595 nanómetros (nm). Para el microanálisis, el colágeno disuelto en ácido cítrico 100 mM (pH 2,4) se divide en alícuotas en pocillos de una placa de 96 pocillos en un volumen total de 0,1 mL (2,5 a 30 µg/ml). A cada pocillo se le añaden 10 µL de reactivo colorante. Las muestras se someten a vórtice, se incuban a temperatura ambiente durante diez minutos antes de medir la absorbancia en un lector de placas a 595 nm. Para una composición de colágeno de la invención, las muestras de ensayo se pueden analizar por triplicado. Las concentraciones de proteína se determinan haciendo referencia a la curva patrón. La concentración de proteína se calcula como el porcentaje del peso seco total de la membrana. Dentro de un margen de error de aproximadamente 10%, el contenido de proteína en cada una de las membranas es esencialmente 95% o más del peso seco total de la membrana. El contenido de agua puede ser bajo y encontrarse dentro del error experimental (aproximadamente 10%).

La estimación del contenido total de colágeno de las composiciones de colágeno de la invención se puede caracterizar utilizando métodos conocidos por los expertos en la técnica e ilustrados en la presente memoria. En una realización específica el contenido de colágeno de una composición de colágeno de la invención se mide utilizando un kit de análisis cuantitativo basado en colorante (SIRCOL) fabricado por Biocolor Ltd., Reino Unido. El análisis utiliza Sirius Red (o Direct Red 80) como colorante de unión a colágeno específico. El colorante unido a colágeno presenta un aumento dependiente de la concentración en la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro UV-Vis. El análisis implica el desarrollo de una curva de calibración patrón midiendo las absorbancias de una serie de patrones de colágeno bovino de concentraciones conocidas. La concentración de colágeno en una muestra de

ensayo, por ejemplo, una muestra de membrana amniótica, se determina mediante referencia a la curva patrón. En un análisis ilustrativo, el colágeno (1 mg/mL) se divide en alícuotas en tubos de microcentrifuga de 1,5 mL a concentraciones de 5-100 µg/100 µL. Los volúmenes de muestra se ajustan a 100 µL con agua. A cada muestra se le añade 1 mL de reactivo colorante SIRCOL a temperatura ambiente. Los tubos de muestra se tapan y se dejan incubando a temperatura ambiente con sacudimiento mecánico durante 30 min. Las muestras se centrifugan a continuación a 12.000 X g durante 15 minutos y el líquido se drena utilizando un pipeteador. El precipitado de color rojizo de la parte inferior de cada tubo se disuelve en 1 mL de NaOH (hidróxido de sodio) 0,5 M. La absorbancia UV para las muestras se mide a 540 nm utilizando un espectrofotómetro DU-7400 UV-VIS Beckman. La curva de calibración patrón se traza utilizando la concentración de colágeno en cada muestra frente a la absorbancia (DO) a 540 nm. Para determinar el error experimental del se repite el análisis (n = 10) a una sola baja concentración de patrón de colágeno (10 µg/100 µL). La muestra de membrana se analiza utilizando el mismo protocolo, añadiéndose la muestra a un volumen total de 100 µL.

En otras realizaciones más, para determinar los tipos de colágeno de las composiciones de colágeno de la invención utilizando métodos convencionales conocidos en la técnica e ilustrados en la presente memoria, p. ej., se puede emplear a análisis ELISA. Un análisis ilustrativo para determinar los tipos de colágeno, p. ej., colágeno de los tipos I, III y IV, en una composición de colágeno de la invención comprende el uso de un análisis ELISA sándwich proporcionado, por ejemplo, como un kit por Anthrogen-CIA Collagen-I de Chondrex, Inc., Redmond, WA, USA. Para los estudios de Tipo III y Tipo IV, se pueden obtener anticuerpos primarios (anticuerpo de captura) y anticuerpos secundarios (anticuerpo de detección) y patrones de colágeno de Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, PA. El anticuerpo de detección es un colágeno Tipo I, III o IV humano biotinilado, que se une a estreptavidina peroxidasa. La reacción enzimática con un sustrato cromogénico y urea y H₂O₂ proporciona un color amarillo, que se detecta a través de espectroscopía UV-Vis a 490 nm. Para cuantificar la cantidad del tipo de Colágeno, se desarrolló una curva de calibración patrón con una muestra de una serie de patrones de colágeno humano de concentraciones conocidas. La concentración de colágeno en una muestra de ensayo de membrana amniótica se determina mediante referencia a la curva patrón. Los protocolos de análisis se desarrollan de acuerdo con las recomendaciones del kit ELISA. Para desarrollar una curva de calibración patrón, se recubren 10-12 pocillos de una bandeja de 96 pocillos con el anticuerpo de captura (anticuerpo anti-colágeno de tipo I humano, no conjugado) añadiendo 100 µL de un Anticuerpo de Captura diluido 100 X proporcionado con el kit. Después de incubar durante la noche, los pocillos se lavan tres veces con un tampón de lavado para eliminar el anticuerpo no unido. El Colágeno humano de Tipo I se añade a continuación a los pocillos a una concentración creciente de 0-5 µg/mL en un volumen de 100 µL. Después de una incubación de dos horas a temperatura ambiente, los pocillos se lavan con el tampón de lavado tres veces para eliminar el colágeno no unido. El anticuerpo para Colágeno-I biotinilado se añade a continuación al complejo de anticuerpo-colágeno en los pocillos en un volumen de 100 µL y se permiten que se unan a la temperatura ambiente durante dos horas. El anticuerpo no unido se lava con tres lavados con el tampón de lavado. La enzima de detección estreptavidina peroxidasa se une a continuación al complejo de anticuerpo-colágeno-anticuerpo añadiendo una muestra de diluida 200 X de la enzima proporcionada con el kit y permitiendo que se incube a temperatura ambiente durante una hora. La placa de 96 pocillos se lava repetidamente (seis veces) para eliminar cualquier enzima no unida. Se añade el sustrato cromogénico + urea/H₂O₂ a cada uno de los pocillos en un volumen de 100 µL. Se deja que la reacción prosiga durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se termina mediante la adición de 50 µL de ácido sulfúrico 2,5 N. La absorbancia se mide a 490 nm.

En otras realizaciones más, la invención incluye ensayos para determinar el contenido total de elastina de las composiciones de colágeno de la invención utilizando métodos conocidos en la técnica e ilustrados en la presente memoria. Un análisis ilustrativo para medir el contenido de elastina de una composición de colágeno de la invención puede comprender un kit de análisis cuantitativo basado en colorante (FASTIN) fabricado por Biocolor Ltd., Reino Unido. El análisis utiliza 5,10,15,20-tetrafenil-21,23-porfirina (TPPS) como colorante de unión a elastina específico (véase, p. ej., Winkelman, J. (1962), Cancer Research, 22, 589-596). El colorante unido a elastina presenta un aumento dependiente de la concentración en la absorbancia a 513 nm en un espectrofotómetro UV-Vis. El análisis implica el desarrollo de una curva de calibración patrón midiendo las absorbancias de una serie de patrones de elastina bovina de concentraciones conocidas. La concentración de elastina en una muestra de ensayo, por ejemplo, muestra de la membrana amniótica, se determina mediante referencia a la curva patrón. La elastina (1 mg/mL) se divide en alícuotas en tubos de microcentrifuga de 1,5 mL a concentraciones de 5 a 100 µg/100 µL. Los volúmenes de muestra se ajustan a 100 µL con agua. A cada muestra se le añade 1 mL de Reactivo de precipitación Elastina (ácido tricloroacético + arginina) a 4°C y se almacena durante la noche a la misma temperatura. Después de la etapa de precipitación durante la noche, las muestras se centrifugan a 12.000 X g durante 15 minutos y el líquido se drena utilizando un pipeteador. A cada muestra, se le añade 1 mL del reactivo colorante FASTIN (TPPS) con 100 µL de sulfato de amonio saturado al 90%. Los tubos de la muestra se tapan y se dejan incubando a temperatura ambiente con agitación mecánica durante 1 hora. El sulfato de amonio sirve para precipitar el complejo de elastina-colorante. Después de la etapa de mezclado durante 1 h, las muestras se centrifugan a 12.000 X g durante 15 minutos y el líquido se drena utilizando un pipeteador. El producto precipitado de color pardo del fondo de cada tubo se disuelve en 1 mL de reactivo de disociación FASTIN que es una disolución de guanidina-HCl en 1-propanol. La absorbancia UV para las muestras se mide a 513 nm utilizando un espectrofotómetro DU-7400 UV-VIS Beckman. La curva de calibración patrón se traza utilizando la concentración de elastina en cada muestra frente a la absorbancia (DO) a 513 nm. Para determinar el error experimental en el análisis, el análisis se repite (n = 10) a una sola baja concentración de patrón de elastina (10 µg/100 µL). La muestra de membrana se analiza utilizando el mismo

protocolo, añadiéndose la muestra a un volumen total de 100 µL. Cada muestra se analiza por triplicado.

En otras realizaciones más, la invención incluye análisis para la determinación del contenido total de glicosaminoglicano (GAG) de las composiciones de colágeno de la invención utilizando métodos conocidos en la técnica e ilustrados en la presente memoria. La presencia de GAG en una composición de colágeno de la invención se puede medir utilizando un kit de análisis cuantitativo basado en colorante (BLYSCAN) fabricado por Biocolor Ltd., Reino Unido. El análisis utiliza, azul de 1,9-dimetil-metileno como colorante de unión a GAG específico. El colorante unido a GAG presenta un aumento dependiente de la concentración en la absorbancia a 656 nm en un espectrofotómetro UV-Vis. El análisis implica el desarrollo de una curva de calibración patrón midiendo las absorbancias de una serie de patrones de GAG bovinos de concentraciones conocidas. La concentración de GAG en una muestra de ensayo de membrana amniótica se determina mediante referencia a la curva patrón. El GAG bovino (0,1 mg/mL) se divide en alícuotas en tubos de microcentrífuga de 1,5 mL a concentraciones de 0,5 a 5 µg/100 µL. Los volúmenes de muestra se ajustan a un 100 µL con agua. A cada muestra se le añade 1 mL de reactivo colorante de 1,9-dimetil-metileno a temperatura ambiente. Los tubos de muestra se tapan y se dejan incubando a temperatura ambiente con agitación mecánica durante 30 minutos. A continuación las muestras se centrifugan a 12.000 xg durante 15 minutos y el líquido se drena utilizando un pipeteador. El producto precipitado de color rojizo del fondo de cada tubo se disolvió en 1 mL de reactivo de disociación de colorante. La absorbancia UV para las muestras se mide a 656 nm utilizando un espectrofotómetro DU-7400 UV-VIS Beckman. La curva de calibración patrón se traza utilizando la concentración de GAG en cada muestra frente a la absorbancia (DO) a 540 nm. Para determinar el error experimental en el análisis, el análisis se repite (n = 8) a una sola baja concentración de patrón de GAG (1 µg/100 µL). La muestra de membrana se analiza utilizando el mismo protocolo, añadiéndose la muestra a un volumen total de 100 µL. Cada muestra se analiza por triplicado.

En otras realizaciones más, la invención incluye análisis para determinar el contenido total de laminina de las composiciones de colágeno de la invención utilizando métodos conocidos en la técnica e ilustrados en la presente memoria. Un análisis ilustrativo para la determinación del contenido total de laminina en una composición de colágeno de la invención puede comprender lo siguiente: se puede utilizar un análisis ELISA sándwich proporcionado como un kit de Takara Bio Inc., Shiga, Japón (Núm. de Cat. MKIO7. El kit incluye una placa de 96 pocillos previamente recubierta con el anticuerpo primario (Anticuerpo de Captura), que es un anticuerpo monoclonal murino para laminina humana. Los anticuerpos secundarios (anticuerpo de Detección) y los patrones de laminina humana se proporcionan con el kit. El anticuerpo de detección es un anticuerpo de laminina humana conjugado con peroxidasa. La reacción enzimática con un sustrato cromogénico de tetrametilbencidina y H₂O₂ proporciona un color azul, que se detecta por medio de espectroscopía UV-Vis a 450 nm. Para cuantificar la cantidad de laminina, se desarrolla una curva de calibración patrón con una muestra de una serie de patrones de laminina humana de concentraciones conocidas (proporcionados con el kit). La concentración de laminina en una muestra de ensayo de membrana amniótica se determina mediante referencia a la curva patrón. Los protocolos de análisis se desarrollan de acuerdo con las recomendaciones del kit de Elisa. Para desarrollar una curva de calibración patrón, se añade el patrón de laminina humana a concentraciones crecientes de 5 ng/mL a 160 ng/mL en un volumen final de 100 µL a pocillos individuales de una bandeja de 96 pocillos previamente recubierta con anticuerpo proporcionada con el kit. Después de una hora de incubación a temperatura ambiente, los pocillos se lavan con el tampón de lavado 3 veces (PBS que contiene TWEEN® 0,05%) para eliminar la laminina no unida. El anticuerpo de laminina conjugado con peroxidasa se añade a continuación al complejo de anticuerpo-laminina en los pocillos en un volumen de 100 µL y se permite que se unan a la temperatura ambiente durante 1 hora. La placa de 96 pocillos se lava varias veces (4X) para eliminar cualquier producto conjugado enzima no unida/anticuerpo. El sustrato cromogénico + H₂O₂ se añade a cada uno de los pocillos en un volumen de 100 µL. Se permite que la reacción continúe durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se termina mediante la adición de 100 µL de ácido sulfúrico 2,5 N. La absorbancia se mide a 450 nm. Las muestras de membrana solubilizada se someten a ensayo a una concentración de 1000 ng/mL. Cada muestra de membrana se somete a ensayo por triplicado. La concentración de laminina se presenta como una concentración del peso total de membrana como se muestra a continuación.

En otras realizaciones más, la invención incluye análisis para determinar el contenido total de fibronectina de las composiciones de colágeno de la invención utilizando métodos conocidos en la técnica e ilustrados en la presente memoria. Un análisis ilustrativo para la determinación del contenido total de fibronectina de una composición de colágeno de la invención puede comprender lo siguiente: se puede utilizar un análisis ELISA sándwich proporcionado como un kit de Takara Bio Inc., Shiga, Japón (Núm. de Cat. MK1 15). El kit incluye una placa de 96 pocillos previamente recubierta con el anticuerpo primario (Anticuerpo de Captura), un anticuerpo monoclonal murino para fibronectina humana. Los anticuerpos secundarios (anticuerpo de Detección) y los patrones de fibronectina humana se proporcionan con el kit. El anticuerpo de detección es un anticuerpo de fibronectina humana conjugado con peroxidasa de rábano picante. La reacción enzimática con un sustrato cromogénico de tetrametilbencidina y H₂O₂ proporciona un color azul, que se detecta por medio de espectroscopía UV-Vis a 450 nm. Para cuantificar la cantidad de fibronectina, se desarrolla una curva de calibración patrón con una muestra de una serie de patrones de fibronectina humana de concentraciones conocidas (proporcionada con el kit). La concentración de fibronectina en una muestra de ensayo se determina mediante referencia a la curva patrón. Los protocolos de análisis se desarrollan de acuerdo con las recomendaciones del kit ELISA. Para desarrollar una curva de calibración patrón, se añade el patrón de fibronectina humana a concentraciones crecientes de 12,5 ng/mL a 400 ng/mL en un volumen final de 100 µL a los pocillos individuales de una bandeja de 96 pocillos previamente recubierta con anticuerpo proporcionada

con el kit . Después de una incubación de 1 hora a temperatura ambiente, los pocillos se lavan con el tampón de lavado 3 veces (PBS que contiene TWEEN® al 0,05%) para eliminar la fibronectina no unida. El anticuerpo de fibronectina conjugado con peroxidasa se añade a continuación al complejo de anticuerpo- fibronectina en los pocillos en un volumen de 100 µL y se permite la unión a temperatura ambiente durante 1 hora. La placa de 96 pocillos se lava varias veces (4X) para eliminar cualquier producto conjugado de enzima/anticuerpo no unido. El sustrato cromogénico + H₂O₂ se añade a cada uno de los pocillos en un volumen de 100 µL. Se permite que la reacción prosiga durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se termina mediante la adición de 100 µL de ácido sulfúrico 2,5 N. La absorbancia se mide a 450 nm. Las muestras de membrana solubilizada se someten a ensayo a una concentración de 1.000 µg/ml. Cada muestra de membrana se somete a ensayo por triplicado.

6.4.2. Estudios de biocompatibilidad

Las composiciones de colágeno de la invención son de origen biológico y contienen cantidades significativas de colágeno. Sin embargo, a diferencia del colágeno derivado de fuentes animales (bovino y porcino), el colágeno humano es no inmunogénico. Debido a que el tejido humano no inmunogénico es intrínsecamente biocompatible con otro tejido humano, no es necesario realizar varias de las pruebas de biocompatibilidad convencionales (p. ej., irritación y sensibilización dérmica, toxicidad sistémica aguda). Se describen análisis para determinar la biocompatibilidad de la composición de colágeno de la invención. Biocompatibilidad según se utiliza en la presente memoria se refiere a la propiedad de ser biológicamente compatible al no producir una respuesta tóxica, perjudicial, o inmunológica o rechazo en el tejido vivo. La respuesta corporal a los materiales desconocidos es una de las principales preocupaciones cuando se utilizan materiales artificiales en el organismo y por lo tanto la biocompatibilidad de un material es una consideración de diseño importante en tales materiales. Los análisis de biocompatibilidad incluidos en la invención incluyen los análisis de citotoxicidad, ensayos de irritación de ojo de conejo, análisis de hemólisis y análisis de pirogenicidad. Los análisis de biocompatibilidad de la invención son análisis basados en células o libres de células.

En otra realización específica más, la citotoxicidad de la composición de colágeno de la invención se determina utilizando un ensayo de elución ISO MEM (Ejemplo 6.4.2.2). El propósito de este estudio es evaluar la capacidad de la composición de colágeno para inducir una respuesta citotóxica en fibroblastos de ratón cultivados. En un análisis ilustrativo, se utiliza medio Esencial Mínimo de Eagle (E-MEM) con un suplemento de Suero Bovino Fetal (FBS) al 5% para extraer las muestras de ensayo. El medio también tiene un suplemento de uno o más de los siguientes: L-glutamina, HEPES, gentamicina, penicilina, vancomicina, y anfotericina B (Fungizona). Los cultivos de células L-929 (fibroblastos de ratón) se hacen crecer y se utilizan en monocapas como material de laboratorio desechable para cultivo de tejidos a 37 ± 1°C en una atmósfera humidificada de dióxido de carbono al 5 ± 1% en el aire. Las muestras de ensayo se extraen intactas utilizando una razón equivalente de una muestra de 120 cm² y 20 mL de E-MEM más SFB al 5%. Las muestras de ensayo se extraen en E-MEM más FBS al 5% a 37 ± 1°C en dióxido de carbono al 5 ± 1% durante 24 - 25 horas. Después del período de extracción, se retira el medio de cultivo de mantenimiento de los pocillos de cultivo de ensayo y se sustituye por 1 mL del medios de ensayo/extracto y medio de control/extractos y medios de control positivos enriquecidos con cloruro de cadmio. Los controles positivos, intermedios y negativos se ejecutan en paralelo con las muestras de ensayo. El medio de ensayo/extracto y el medio de control/extracto y el medio de control positivo enriquecido con cloruro de cadmio se cultivan en placa por triplicado y se incuban 72 ± 4 horas a 37 ± 1°C en una atmósfera humidificada de dióxido de carbono al 5 ± 1% en aire. Los cultivos se evalúan para determinar los efectos citotóxicos mediante observación microscópica a períodos de incubación de 24, 48 y 72 ± 4 horas. Los criterios para la evaluación de la citotoxicidad incluirán cambios morfológicos en las células, tales como granulación, crenación o redondeo, y la pérdida de células viables de la monocapa por lisis o desprendimiento. La validez del ensayo requiere que los cultivos de control negativos mantengan una apariencia normal sana durante toda la duración del ensayo. Los grados de toxicidad se puntúan como sigue:

- 0 Ninguno: Gránulos intracitoplasmáticos discretos; sin lisis celular.
- 1 Escaso: No más de 20% de las células son redondas, débilmente ancladas, y sin gránulos intracitoplasmáticos; se encuentran presentes células lisadas ocasionales.
- 2 Leve: No más del 50% de las células son redondas y desprovistas de gránulos intracitoplasmáticos; no hay lisis celular intensa ni zonas vacías entre células.
- 3 Moderado: No más de 70% de las capas celulares contienen células redondeadas y/o están lisadas.
- 4 Grave: Destrucción casi completa de las capas celulares.

De acuerdo con la USP, los artículos de ensayos que puntúan "0", "1" o "2" se considerarán no tóxicos. Los artículos de ensayo que puntúan "3" o "4" se considerarán tóxicos. La muestra de control positiva debe tener una puntuación de "3" o "4" y la muestra de control negativa debe tener una puntuación de "0" para un ensayo válido.

Se sabe que la superficie ocular del conejo es más sensible que la piel humana, por lo tanto se utilizan estudios de irritación del ojo de conejo para evaluar la biocompatibilidad de una composición de colágeno de la invención. En un análisis ilustrativo, las muestras se escrutan para determinar la irritación ocular primaria. La membrana amniótica se limpia utilizando una disolución acuosa de sal de sodio de monohidrato de ácido desoxicólico al 0,05% (D-Cell). El

5 ensayo se puede realizar de acuerdo con las directrices de las Regulaciones Federales del Acta para Sustancias Peligrosas (FHSA), 16 CFR 1500. En un análisis ilustrativo, los ojos de control son evaluados clínicamente como normales para conejos mediante el examen macroscópico con una fuente de luz auxiliar. Para detectar cualquier
 10 lesión en la córnea pre-existente los ojos se tratan con tinción con fluoresceína, se enjuagan con solución salina fisiológica (PSS) USP al 0,9% y se observan con luz ultravioleta en una habitación oscura. Se instila una muestra en el saco conjuntival inferior de un ojo de cada conejo de acuerdo con las técnicas convencionales. El ojo contrario de cada conejo permanece sin tratar y sirve como control comparativo. Los animales se devuelven a sus jaulas después del tratamiento. A las 24, 48, y 72 horas de la dosificación el ojo de ensayo de cada conejo se examina con una
 15 fuente de luz auxiliar y un aumento apropiado en comparación con el ojo de control no tratado, y se gradúa para la irritación ocular. Para detectar o confirmar la lesión en la córnea los ojos de ensayo se tratan con tinción de fluoresceína, se enjuagan con PSS, y se examinan en condiciones de oscuridad con una lámpara ultravioleta a las 24 horas. Las reacciones se puntúan de acuerdo con los criterios de puntuación de Draize modificados por FHSA. Uno de los tres animales que presentan una reacción positiva significativa es un descubrimiento dudoso. Dos de los tres animales que presentan una reacción positiva significativa constituyen una respuesta positiva significativa y el artículo de ensayo se considera un irritante.

20 Determinación de las propiedades hemolíticas de una composición de colágeno de la invención utilizando métodos conocidos en la técnica e ilustrados en la presente memoria (véase el Ejemplo 6.4.2.4). La hemólisis describen las propiedades hemolíticas de una muestra de ensayo que entrará en contacto con la sangre. Se considera como un ensayo de escrutinio especialmente significativo para llevar a cabo, ya que mide la fragilidad de la membrana de los glóbulos rojos en contacto con materiales y dispositivos. En un análisis ilustrativo, el procedimiento implica la exposición del material de ensayo a una suspensión de células de la sangre y a continuación la determinación de la cantidad de hemoglobina liberada. El ensayo se ejecuta en condiciones estáticas con contacto directo de la muestra de ensayo con sangre humana. La cantidad de hemoglobina liberada por los glóbulos rojos se mide espectrofotométricamente a 540 nm (después de la conversión en cianomethemoglobina) simultáneamente con los
 25 controles negativos y positivos. El índice hemolítico para las muestras y los controles se calcula como sigue:

$$\text{Índice hemolítico} = \text{Hemoglobina Liberada (mg/mL)} \times 100$$

$$\text{Hemoglobina Presente (mg/mL)}$$

$$\text{Dónde: hemoglobina liberada (mg/mL)} = (\text{Constante} + \text{Coeficiente X}) \times \text{densidad óptica} \times 16. \text{ Hemoglobina presente (mg/mL)} = \text{sangre diluida } 10 \pm 1 \text{ mg/mL}$$

30 También se describen métodos para determinar la pirogenicidad de la composición de colágeno de la invención utilizando métodos conocidos en la técnica e ilustrados en la presente memoria (Véase el Ejemplo 6.4.2.5). En una realización, la pirogenicidad de la composición de colágeno de la invención se determina mediante la medición de la presencia de endotoxina bacteriana en la composición de colágeno de la invención, utilizando por ejemplo el ensayo de Producto Lisado de Amebocitos de Limulus (LAL). Este ensayo es un análisis in vitro para la detección y
 35 cuantificación de la endotoxina bacteriana. En un ensayo ilustrativo, se someten a ensayo noventa y ocho muestras de composición de colágeno (n = 1 por lote), midiendo cada una 1 x 2 cm, individualmente para la extracción. Las extracciones se llevan a cabo mediante el lavado de cada muestra en 30 mL de fluido de extracción durante 40 a 60 minutos a 37 a 40°C con agitación intermitente en un agitador orbital. El pH de cada extracto de muestra está entre 6 y 8 como se verifica con papel de pH. Los niveles de pirógeno se miden mediante un ensayo Colorimétrico Turbidimétrico Cinético con una sensibilidad de ensayo de 0,05 unidades de endotoxina (UE) por mL. El nivel total de endotoxina por muestra se calcula multiplicando el valor detectado de endotoxina (UE/mL) por 30 mL (volumen de extracción por dispositivo) y de nuevo por veinticuatro (para simular un dispositivo de 6 x 8 cm de tamaño).

6.4.3. Estudios microbiológicos

45 Métodos conocidos en la técnica e ilustrados en la presente memoria para determinar la presencia de organismos microbiológicos incluyendo *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus viridans*, y *Pseudomonas aeruginosa* en una composición de colágeno de la invención. Tales métodos se pueden utilizar en cualquier etapa de la preparación de la composición de colágeno. Un procedimiento ilustrativo para los estudios de microbiología durante el procesamiento comprende lo siguiente: Someter a ensayo las muestras "enriquecidas" microbiológicamente de membrana amniótica no
 50 procesada y los equipos utilizados durante el procesamiento. Las muestras se sumergen durante cinco minutos en solución salina enriquecida con los ocho microorganismos siguientes para contaminar deliberadamente la muestra:

1.	<i>Escherichia coli</i>	5.	<i>Candida albicans</i>
2.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6.	<i>Proteus vulgaris</i>
3.	<i>Staphylococcus aureus</i>	7.	<i>Staphylococcus viridans</i>
4.	<i>Enterococcus faecalis</i>	8.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Ventajosamente, los métodos de descelularización y enjuagado de la invención pueden reducir el número de microorganismos en la composición de colágeno de la invención.

5 Se describen métodos conocidos en la técnica e ilustrados en la presente memoria para determinar la biocarga de las composiciones de colágeno de la invención. Según se utiliza en la presente memoria, "biocarga" es una medida de los organismos contaminantes que se encuentran en una cantidad dada de material antes de que se someta a un procedimiento de esterilización industrial. En un método ilustrativo, se determina la dosis de radiación de haz de electrones mínima que lograría la esterilidad con un Nivel de Aseguramiento de Esterilidad 10-6. Las membranas se extraen mediante inmersión y sacudimiento manual utilizando Disolución de PEPTONA-TWEEN®. El método de cultivo en placa es la filtración de membrana utilizando agar digerido de soja-caseína. Para las condiciones aeróbicas las placas se incuban durante 4 días a 30-35°C, a continuación se cuentan. Para los hongos, las placas se incuban durante cuatro días a 20-25°C, a continuación se cuentan. Para las bacterias formadoras de esporas, la porción del extracto se somete a choque térmico, se filtra y se cultiva en placa como las bacterias aeróbicas. Las placas se incuban durante 4 días a 30-35°C, a continuación se cuentan para determinar las bacterias anaerobias, las placas se incuban en condiciones anaerobias durante 4 días a 30-35°C, a continuación se cuentan. Los microorganismos utilizados son *Clostridium sporogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Bacillus atrophaeus*.

En realizaciones concretas, las composiciones de colágeno de la invención tienen menos de 2 unidades formadoras de colonias (ufc) para aerobios y hongos, menos de 1, o cero ufc para aerobios y hongos. En otras realizaciones más, las composiciones de colágeno de la invención tienen menos de 5,1 unidades formadoras de colonias (ufc), menos de 2, o menos de 1 ufc para anaerobios y esporas.

20 En realizaciones concretas, la composición de colágeno de la invención no es bacteriostática ni fungistática según se determina utilizando métodos ilustrados en la presente memoria y conocidos por los expertos en la técnica (Véase el Ejemplo 6.4.3.2). Según se utiliza en la presente memoria bacteriostático hace referencia a un agente que inhibe el crecimiento o la reproducción bacterianos, pero no destruye las bacterias. Según como se utiliza en la presente memoria fungistático se refiere a un agente que evita el crecimiento de un hongo por la presencia de un agente químico o físico no fungicida.

6.4.4. Almacenamiento y manipulación de la composición de colágeno

Se describe en la presente memoria el almacenamiento de la composición de colágeno de la invención a temperatura ambiente (p. ej., 25°C). En ciertas realizaciones, la composición de colágeno de la invención se puede almacenar a una temperatura de al menos 0°C, al menos 4°C, al menos 10°C, al menos 15°C, al menos 20°C, al menos 25°C, al menos 30°C, al menos 35°C o al menos 40°C. En algunas realizaciones, la composición de colágeno de la invención no está refrigerada. En algunas realizaciones, la composición de colágeno de la invención puede estar refrigerada a una temperatura de aproximadamente 2 a 8°C. En otras realizaciones, la composición de colágeno de la invención se puede almacenar a cualquiera de las temperaturas anteriormente identificadas durante un período prolongado de tiempo. En una realización concreta, la composición de colágeno de la invención se almacena en condiciones estériles y no oxidantes. En ciertas realizaciones, la composición de colágeno producida de acuerdo con los métodos de la invención se puede almacenar a cualquiera de las temperaturas especificadas durante 12 meses o más sin alteración de la integridad bioquímica o estructural (p. ej., sin degradación), sin ninguna alteración de las propiedades bioquímicas o biofísicas de la composición de colágeno. En ciertas realizaciones, la composición de colágeno producida de acuerdo con los métodos de la invención se puede almacenar durante varios años sin alteración en la integridad bioquímica o estructural (p. ej., sin degradación), sin ninguna alteración de las propiedades bioquímicas o biofísicas de la composición de colágeno. En ciertas realizaciones, se espera que la composición de colágeno de la invención preparada de acuerdo con los métodos de la invención dure indefinidamente. La composición de colágeno se puede almacenar en cualquier recipiente adecuado para su almacenamiento a largo plazo. Ventajosamente, la composición de colágeno de la invención se puede almacenar en un envase de bolsa abre fácil doble estéril.

6.4.5. Esterilización

Las composiciones de colágeno de la invención se pueden esterilizar de acuerdo con mecanismos conocidos por los expertos en la técnica para la esterilización de tales composiciones.

50 En ciertas realizaciones, la composición de colágeno se filtra a través de un filtro que permite el paso de endotoxinas y retiene la composición de colágeno. Se puede utilizar cualquier filtro de un tamaño, por ejemplo 30 kDa, conocido por los expertos en la técnica para la filtración de endotoxinas. En ciertas realizaciones, la composición de colágeno se pone en contacto con el filtro en condiciones que permitan a las endotoxinas pasar a través del filtro a la vez que retienen la composición de colágeno. Las condiciones pueden ser cualquiera de las condiciones para la filtración conocidas por los expertos en la técnica, por ejemplo, centrifugación o bombeo. El filtro debe ser de un tamaño que retenga el colágeno al tiempo que permite el paso de endotoxinas por el filtro. En ciertas realizaciones, el filtro está entre 5 kDa y 100 kDa. En realizaciones concretas, el filtro es de aproximadamente 5 kDa, aproximadamente 10 kDa, aproximadamente 15 kDa, aproximadamente 20 kDa, aproximadamente 30 kDa, aproximadamente 40 kDa, aproximadamente 50 kDa, aproximadamente 60 kDa, aproximadamente 70 kDa, aproximadamente 80 kDa, aproximadamente 90 kDa o aproximadamente 100 kDa. El filtro puede ser de cualquier material conocido por los

expertos en la técnica por ser compatible con una composición de colágeno, tal como celulosa, polietersulfona y otros evidentes para los expertos. La filtración puede ser repetida tantas veces como se desee por un experto en la técnica. La endotoxina puede ser detectada de acuerdo con técnicas convencionales para supervisar el aclaramiento.

- 5 En ciertas realizaciones, la composición de colágeno se puede filtrar para generar composiciones de colágeno libres, o con una carga reducida, de partículas virales. Ventajosamente, en estas realizaciones de la invención, el filtro retiene una composición de colágeno a la vez que permite que las partículas virales pasen a través. Se puede utilizar cualquier filtro conocido por los expertos en la técnica por ser útil para el aclaramiento de virus. Por ejemplo, se puede utilizar un filtro de 1.000 kDa para el aclaramiento, o la reducción, de parvovirus, virus de la hepatitis A y VIH.
- 10 Se puede utilizar un filtro de 750 kDa para el aclaramiento, o la reducción, de parvovirus y virus de la hepatitis A. Se puede utilizar un filtro de 500 kDa para el aclaramiento, o la reducción, de parvovirus.

Por consiguiente, la presente invención proporciona métodos para producir composiciones de colágeno libres, o con una carga reducida, de partículas virales, que comprenden la etapa de poner en contacto una composición de colágeno con un filtro de un tamaño que permita que una o más partículas virales pasen a través del filtro a la vez que retienen la composición de colágeno. En ciertas realizaciones, la composición de colágeno se pone en contacto con el filtro en condiciones que permitan que una o más partículas virales pasen a través del filtro a la vez que retienen la composición de colágeno. Las condiciones pueden ser cualquiera de las condiciones para la filtración conocidas por los expertos en la técnica, por ejemplo, centrifugación o bombeo. El filtro debe ser de un tamaño que retenga el colágeno a la vez que permita que una o más partículas virales pasen a través del filtro. En ciertas realizaciones, el filtro está entre 500 kDa y 1.000 kDa. En realizaciones concretas, el filtro es de aproximadamente 500 kDa, aproximadamente 750 kDa o aproximadamente 1.000 kDa. El filtro puede ser de cualquier material conocido por los expertos en la técnica por ser compatible con una composición de colágeno, tal como celulosa, polietersulfona y otros evidentes para los expertos. La filtración puede ser repetida tantas veces como se desee por un experto en la técnica. Las partículas virales se pueden detectar de acuerdo con técnicas convencionales para supervisar filtración.

15

20

25

La esterilización de una composición de colágeno de la invención también se puede llevar a cabo por irradiación de haces de electrones utilizando métodos conocidos por los expertos en la técnica, *p. ej.*, Gorham, D. Byrom (ed)., 1991, *Biomaterials*, Stockton Press, Nueva York, 55-122. Cualquier dosis de radiación suficiente para destruir al menos el 99,9% de las bacterias u otros organismos potencialmente contaminantes se encuentra dentro del alcance de la invención. En una realización concreta, se utiliza una dosis de al menos 18-25 kGy para lograr la esterilización terminal de una composición de colágeno de la invención.

30

6.5 Formulaciones de las composiciones de colágeno

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones de colágeno. El colágeno puede ser cualquier colágeno de la invención, por ejemplo colágeno preparado por uno de los métodos de la presente memoria. Ventajosamente, el colágeno se puede formular en agua o en solución salina tamponada con fosfato. En realizaciones concretas, el colágeno se formula solución salina tamponada con fosfato.

35

El colágeno puede estar a cualquier concentración útil para los expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, las formulaciones de la invención comprenden 0,1-100 mg/ml, 1-100 mg/ml, 1-75 mg/ml, 1-50 mg/ml, 1-40 mg/ml, 10-40 mg/mL o 20-40 mg/mL de colágeno. En ciertas realizaciones, las formulaciones de la invención comprenden aproximadamente 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml, 30 mg/ml, 35 mg/ml, 40 mg/mL, 45 mg/mL o 50 mg/mL de colágeno. En una realización concreta, la presente invención proporciona formulaciones que comprenden aproximadamente 35 mg/mL de colágeno.

40

En ciertas realizaciones de la invención, una composición de colágeno se puede secar y conformar en una forma útil por el experto en la técnica. La forma puede ser cualquier forma útil, incluyendo láminas, tubos, tapones, esferas. En ciertas realizaciones, la composición de colágeno se forma para ajustarse a un sitio de una herida o lesión. La composición de colágeno conformada se puede utilizar para cualquier propósito evidente para los expertos en la técnica. Los métodos ilustrativos de la utilización de las composiciones de colágeno conformadas se proporcionan a continuación.

45

La composición de la invención, según se extrae de la placenta, es típicamente una pasta de color blanco. Esta pasta se puede conformar de acuerdo con cualquiera de los métodos conocidos en la técnica para la conformación de tales materiales. Por ejemplo, la composición puede introducir a la fuerza en un molde, o formar alrededor de un molde, para producir formas específicas, y secar con calor, secar a vacío o secar por congelación. La composición también se puede extender delgada y secar, *p. ej.*, sobre un secador de gel, *p. ej.*, utilizando vacío.

50

En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención se pueden combinar con portadores farmacéutica o cosméticamente aceptables y administrarse en forma de composiciones *in vitro* o *in vivo*. Las formas de administración incluyen inyecciones, disoluciones, cremas, geles, implantes, bombas, ungüentos, emulsiones, suspensiones, microesferas, partículas, micropartículas, nanopartículas, liposomas, pastas, parches, comprimidos, dispositivos de liberación transdérmica, pulverizaciones, aerosoles, u otros medios familiares para un experto normal

55

en la técnica. Tales portadores farmacéutica o cosméticamente aceptables son comúnmente conocidos por un experto normal en la técnica. Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención se pueden preparar mediante procedimientos conocidos en la técnica utilizando ingredientes bien conocidos y fácilmente asequibles. Por ejemplo, los compuestos se pueden formular con excipientes, diluyentes, o portadores comunes, y formar comprimidos, cápsulas, suspensiones, polvos. Los ejemplos de los excipientes, diluyentes y portadores que son adecuados para tales formulaciones incluyen los siguientes: cargas y expansores (p. ej., almidón, azúcares, manitol y derivados silícicos); agentes aglutinantes (p. ej., carboximetilcelulosa y otros derivados de celulosa, alginatos, gelatina, y polivinilpirrolidona); agentes humectantes (p. ej., glicerol); agentes disgregantes (p. ej., carbonato de calcio y bicarbonato de sodio); agentes para retardar la disolución (p. ej., parafina); aceleradores de la resorción (p. ej., compuestos de amonio cuaternario); agentes tensioactivos (p. ej., alcohol cetílico, monoestearato de glicerol); portadores adsorbentes (p. ej., caolín y bentonita); emulsionantes; conservantes; edulcorantes; estabilizantes; agentes colorantes; agentes perfumantes; agentes aromatizantes; lubricantes (p. ej., talco, estearato de calcio y magnesio); polietilenglicoles sólidos; y sus mezclas.

Los términos "portador farmacéuticamente o cosméticamente aceptable" o "vehículo farmacéuticamente o cosméticamente aceptable" se utilizan en la presente memoria para significar, sin limitaciones, cualquier líquido, sólido o semisólido, incluyendo agua o solución salina, un gel, crema, pomada, disolvente, diluyente, base de ungüento fluido, ungüento, pasta, implante, liposoma, micela, micela gigante, y similares, que sea adecuado para su uso en contacto con un tejido animal o humano vivo sin causar respuestas fisiológicas o cosméticas adversas, y que no interacte con los otros componentes de la composición de una manera perjudicial. Otros portadores o vehículos farmacéuticamente o cosméticamente aceptables conocidos por los expertos en la técnica se pueden emplear para elaborar composiciones para liberar las moléculas de la presente invención.

Las formulaciones se pueden constituir de forma que liberen el ingrediente activo sólo o preferiblemente en una localización concreta, posiblemente a lo largo de un período de tiempo. Tales combinaciones proporcionan todavía un mecanismo adicional para controlar la cinética de liberación. Se pueden preparar recubrimientos, envolturas y matrices protectoras, por ejemplo, a partir de sustancias poliméricas o ceras.

Los métodos de administración *in vivo* de las composiciones de la presente invención, o de formulaciones que comprenden tales composiciones y otros materiales tales como portadores de la presente invención que son particularmente adecuados para diversas formas incluyen la administración oral (p. ej., administración bucal o sublingual), administración anal, administración rectal, administración en forma de supositorio, aplicación tópica, aplicación en aerosol, inhalación, administración intraperitoneal, administración intravenosa, administración transdérmica, administración intradérmica, administración subdérmica, administración intramuscular, administración intrauterina, administración vaginal, administración en una cavidad corporal, administración quirúrgica en la localización de un tumor o lesión interna, administración en el lumen o parénquima de un órgano, y administración parenteral. Las técnicas útiles en las diversas formas de administraciones arriba incluyen la aplicación tópica, ingestión, administración quirúrgica, inyectables, pulverizaciones, dispositivos de liberación transdérmica, bombas osmóticas, electrodeposición directa en un sitio deseado, u otros medios familiares para un experto normal en la técnica. Los sitios de aplicación pueden ser externos, tal como en la epidermis, o internos, por ejemplo, una úlcera gástrica, un campo quirúrgico, o en otro lugar.

Las composiciones de colágeno de la presente invención se pueden aplicar en la forma de cremas, geles, soluciones, suspensiones, liposomas, partículas, u otros medios conocidos por los expertos en la técnica de formulación y liberación de compuestos terapéuticos y cosméticos. Se pueden utilizar tamaños de partícula ultrafinos de materiales de colágeno para la administración mediante inhalación de agentes terapéuticos. Algunos ejemplos de formulaciones apropiadas para la administración subcutánea incluyen implantes, depósitos, agujas, cápsulas, y bombas osmóticas. Algunos ejemplos de formulaciones apropiadas para administración vaginal incluyen cremas y anillos. Algunos ejemplos de formulaciones apropiadas para la administración oral incluyen: píldoras, líquidos, jarabes, y suspensiones. Algunos ejemplos de formulaciones apropiadas para la administración transdérmica incluyen geles, cremas, pastas, parches, pulverizaciones y geles. Algunos ejemplos de mecanismos de liberación adecuados para la administración subcutánea incluyen implantes, depósitos, agujas, cápsulas, y bombas osmóticas. Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen disoluciones inyectables estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen la formulación isotónica con la sangre del receptor pretendido, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las disoluciones y suspensiones inyectables extemporáneas se pueden preparar a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles utilizados comúnmente por un experto normal en la técnica.

Las realizaciones en las que las composiciones de la invención se combinan, por ejemplo, con uno o más "portadores farmacéuticamente o cosméticamente aceptables" o excipientes pueden presentarse convenientemente en una forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante técnicas farmacéuticas convencionales. Tales técnicas incluyen la etapa de poner en asociación las composiciones que contienen el ingrediente activo y el portador o portadores o el excipiente o excipientes farmacéuticos. En general, las formulaciones se preparan asociando uniforme e íntimamente el ingrediente activo con portadores líquidos. Las formulaciones de dosificación unitaria concretas son aquellas que contienen una dosis o unidad, o una fracción apropiada de la misma, del ingrediente administrado. Se debe entender que además de los ingredientes particularmente mencionados

anteriormente, las formulaciones que comprenden las composiciones de la presente invención pueden incluir otros agentes comúnmente utilizados por un experto normal en la técnica. El volumen de administración variará dependiendo de la ruta de administración. Por ejemplo, las inyecciones intramusculares pueden oscilar en volumen de aproximadamente 0,1 mL a 1,0 mL.

5 Las composiciones de la presente invención se pueden administrar a personas o animales para proporcionar sustancias en cualquier intervalo de dosificación que produzca los resultados fisiológicos o farmacológicos deseados. La dosificación dependerá de la sustancia o sustancias administradas, el criterio de valoración terapéutico deseado, la concentración eficaz deseada en el sitio de acción o en un fluido corporal, y el tipo de administración. La información sobre las dosis apropiadas de las sustancias es conocida por los expertos normales en la técnica y se
10 puede encontrar en referencias tales como L.S. Goodman y A. Gilman, eds, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Macmillan Publishing, Nueva York, y Katzung, *Basic and Clinical Pharmacology*, Appleton y Lang, Norwalk, Connecticut, (6^a ed. 1995). Un médico clínico experto en la técnica de la terapia deseada puede elegir dosificaciones e intervalos de dosificación específicos y la frecuencia de administración, según requieran las circunstancias y las sustancias que se vayan a administrar.

15 La composición de colágeno puede comprender uno o más compuestos o sustancias que no sean colágeno. Por ejemplo, la composición de colágeno puede ser impregnada, ya sea durante la producción o durante la preparación para la cirugía, con una biomolécula. Tales biomoléculas incluyen antibióticos (tales como clindamicina, minociclina, doxiciclina, gentamicina), hormonas, factores de crecimiento, agentes anti-tumorales, agentes anti-fúngicos, agentes anti-virales, medicaciones contra el dolor, antihistamínicos, agentes anti-inflamatorios, anti- infecciosos incluyendo
20 plata (tales como sales de plata, incluyendo nitrato de plata y sulfadiazina de plata), plata elemental, antibióticos, enzimas bactericidas (tal como lisozoma), agentes para la curación de heridas (tales como citoquinas incluyendo PDGF, TGF; timosina), ácido hialurónico como agente de curación de heridas, selladores de heridas (tales como fibrina con o sin trombina), atrayentes celulares y reactivos de andamiaje (tales como fibronectina). En un ejemplo específico, la composición de colágeno puede ser impregnado con al menos un factor de crecimiento, por ejemplo,
25 factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento epitelial, etc. La composición de colágeno también puede estar impregnada con moléculas orgánicas pequeñas tales como inhibidores específicos de determinados procedimientos bioquímicos *p. ej.*, inhibidores de los receptores de membrana, inhibidores de quinasa, inhibidores del crecimiento, fármacos anticancerosos, antibióticos, etc.

En otras realizaciones más, la composición de colágeno de la invención puede combinarse con un hidrogel. Cualquier composición de hidrogel conocida por los expertos en la técnica se incluye en la invención, *p. ej.*, cualquiera de las composiciones de hidrogel descritas en las siguientes revisiones: Graham, 1998, *Med. Device Technol.* 9(1): 18-22; Peppas et al., 2000, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50(1): 27-46; Nguyen et al, 2002, *Biomaterials*, 23(22): 4307-14; Henin et al., 2002, *Adv. Drug Deliv. Rev* 54(1): 13-36; Skelhome et al., 2002, *Med. Device Technol.* 13(9): 19-23; Schmedlen et al, 2002, *Biomaterials* 23: 4325-32. En una realización específica, la
30 composición de hidrogel se aplica sobre la composición de colágeno, es decir, se descarga en la superficie de la composición de colágeno. La composición de hidrogel por ejemplo, se puede pulverizar sobre la composición de colágeno, saturar sobre la superficie de la composición de colágeno, emparar con la composición de colágeno, bañar con la composición de colágeno o recubrir sobre la superficie de la composición de colágeno.

Los hidrogeles útiles en los métodos y composiciones de la invención se pueden elaborar a partir de cualquier polímero interactivo con agua, o soluble en agua conocido en la técnica, incluyendo poli(alcohol vinílico) (PVA), poli(metacrilato de hidroxietilo), polietilenglicol, polivinilpirrolidona, ácido hialurónico, dextrano o derivados y análogos de los mismos.

En algunas realizaciones, la composición de colágeno de la invención se impregna adicionalmente con uno o más biomoléculas antes de ser combinada con un hidrogel. En otras realizaciones, la composición de hidrogel se impregna adicionalmente con una o más biomoléculas antes de ser combinada con una composición de colágeno de la invención. Tales biomoléculas incluyen, antibióticos (tales como la clindamicina, minociclina, doxiciclina, gentamicina), hormonas, factores de crecimiento, agentes antitumorales, agentes antifúngicos, agentes antivirales, medicaciones contra el dolor, antihistamínicos, agentes antiinflamatorios, antiinfecciosos incluyendo plata (tales como sales de plata, incluyendo nitrato de plata y sulfadiazina de plata), plata elemental, antibióticos, enzimas bactericidas (tales como lisozoma), agentes para la curación de heridas (tales como citoquinas incluyendo PDGF, TGF; timosina), ácido hialurónico como agente de curación de heridas, la selladores de heridas (tales como fibrina con o sin trombina), atrayentes celulares y reactivos de andamiaje (tales como fibronectina). En un ejemplo específico, la composición de colágeno o la composición de hidrogel se pueden impregnar al menos con un factor de crecimiento, por ejemplo, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento epitelial, etc. Ventajosamente,
55 la biomolécula puede ser un agente terapéutico.

En algunas realizaciones, la composición de hidrogel se combina con un producto laminado que comprende la composición de colágeno de la invención.

El composición de hidrogel/colágeno tiene utilidad en el campo de la medicina incluyendo, tratamiento de heridas, quemaduras, y afecciones de la piel (*p. ej.*, para tratar la cicatrización), usos cosméticos (*p. ej.*, cirugía estética), y cualquier uso como implante. En algunas realizaciones, la composición de hidrogel/colágeno se aplica tópicamente a
60

un sujeto, es decir, en la superficie de la piel, por ejemplo, para el tratamiento de una herida. En otras realizaciones, la composición de hidrogel/colágeno se puede utilizar en el interior de un sujeto, por ejemplo, como un implante, para convertirse en una estructura permanente o semipermanente en el organismo. En algunas realizaciones, las composiciones de hidrogel se formulan para que no sean biodegradables. En otras realizaciones más, la composición de hidrogel se formula para que sea biodegradable. En una realización específica, la composición de hidrogel se formula para que se degrade en el plazo de días. En otra realización específica, la composición de hidrogel se formula para que se degrade en el plazo de meses.

6.6.1. Células madre de placenta

En una realización, la composición comprende una pluralidad de células madre placentarias CD34⁺. Las células madre placentarias CD34⁺ son células madre, obtenibles a partir de tejido placentario, que se adhieren a un sustrato de cultivo de tejidos y tienen la capacidad de diferenciarse en tipos de células no placentarias. Las células madre de la placenta pueden ser de origen fetal o materno (es decir, pueden tener el genotipo de la madre o el feto). Las poblaciones de células madre placentarias, o poblaciones de células que comprenden células madre placentarias, pueden comprender células madre placentarias que son de origen únicamente fetal o materno, o pueden comprender una población mixta de células madre placentarias, de origen tanto fetal como materno. Las células madre placentarias, y las poblaciones de células que comprenden las células madre placentarias, se pueden identificar y seleccionar por medio de las características morfológicas, marcadoras, y de cultivo comentadas a continuación.

Las células madre placentarias, cuando se cultivan en cultivos primarios o en cultivo celular, se adhieren al sustrato del cultivo de tejidos, *p. ej.*, superficie del recipiente de cultivo de tejidos (*p. ej.*, plástico del cultivo de tejidos). Las células madre placentarias en cultivo adoptan una apariencia generalmente fibroblastoide, estrellada, con varios procesos citoplásmicos que se extienden desde el cuerpo celular central. Las células madre placentarias son, sin embargo, morfológicamente diferenciables de los fibroblastos cultivados en las mismas condiciones, ya que las células madre placentarias muestran un mayor número de estos procesos que los fibroblastos. Morfológicamente, las células madre placentarias también son distinguibles de las células madre hematopoyéticas, que generalmente adoptan una morfología más redondeada, o de adoquín, en cultivo.

Las células madre placentarias generalmente expresan los marcadores CD10, CD73, CD105, CD200, HLA-G, y/o OCT-4, y no expresan CD34, CD38, o CD45. Las células madre placentarias también pueden expresar HLA-ABC (MHC-1) y HLA-DR. Por lo tanto, en una realización, las células madre que se pueden combinar con las composiciones de la invención son CD200⁺ o HLA-G⁺. En otra realización, las células madre placentarias son CD73⁺, CD105⁺, y CD200⁺. En otra realización, la célula madre placentaria es CD200⁺ y OCT-4⁺. En otra realización, las células madre placentarias son CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁺. En otra realización, las células madre placentarias son CD73⁺ y CD105⁺, y, cuando están en una población de células placentarias, facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embriode en condiciones que permitan la formación de cuerpos de tipo embriode. En otra realización, las células madre placentarias son OCT-4⁺ y, cuando están en una población de célula placentarias, facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embriode en una población de célula placentarias aisladas que comprende dicha célula madre cuando se cultivan en condiciones que permiten formación de cuerpos de tipo embriode.

Las células madre placentarias se pueden obtener por perfusión. Por ejemplo, la invención proporciona una población aislada de células madre placentarias que se produce de acuerdo con un método que comprende perfundir una placenta de mamífero que se ha drenado de sangre del cordón y perfundida para eliminar la sangre residual; perfundir dicha placenta con una disolución de perfusión; y recoger dicha disolución de perfusión, en donde dicha disolución de perfusión después de la perfusión comprende una población de célula placentarias que comprende células madre placentarias; y aislar una pluralidad de dichas células madre placentarias a partir de dicha población de células. En una realización específica, la disolución de perfusión se hace pasar a través de la vena umbilical y las arterias umbilicales y se recoge después de que emane de la placenta. Las poblaciones de células madre placentarias producidas por este método comprenden típicamente una mezcla de células fetales y maternas. En otra realización específica, la disolución de perfusión se hace pasar a través de la vena umbilical y se recoge de las arterias umbilicales, o se hace pasar a través de las arterias umbilicales y se recoge de la vena umbilical. Las poblaciones de células madre placentarias producidas por este método típicamente son sustancialmente de origen fetal exclusivamente; es decir, *p. ej.*, más de 90%, 95%, 99%, o 99,5% de las células madre placentarias en la población son de origen fetal.

En diversas realizaciones, las células madre placentarias, contenidas en una población de células obtenidas a partir de la perfusión de la placenta, son al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o al menos 99,5% de dicha población de células placentarias. En otra realización específica, las células madre placentarias recogidas por perfusión comprenden células fetales y maternas. En otra realización específica, las células madre placentarias recogidos por perfusión son al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o al menos 99,5% células fetales.

Las células madre placentarias también se pueden recoger de una placenta de mamífero por rotura física, *p. ej.*, digestión enzimática, del órgano o una porción del mismo. Por ejemplo, la placenta, o una porción de la misma, pueden ser, *p. ej.*, triturada, cortada, picada, cortada en dados, machacada, macerada, mientras está en contacto

con la composición de recolección de células madre de la invención, y el tejido se digiere posteriormente con una o más enzimas. La placenta, o una porción de la misma, también puede ser rota físicamente y digerida con una o más enzimas, y el material resultante sumergido a continuación en, o mezclado con, la composición de recolección de células madre de la invención. Se puede utilizar cualquier método de rotura física, siempre que el método de rotura deje una pluralidad, más preferiblemente una mayoría, y más preferiblemente al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, o 99% de células en dicho órgano viables, según se determina, *p. ej.*, mediante exclusión con azul tripán.

La placenta puede ser diseccionado en componentes antes de la rotura física y/o la digestión enzimática y la recuperación de las células madre. Por ejemplo, las células madre placentarias se pueden obtenerse de la membrana amniótica, el corion, el cordón umbilical, los cotiledones placentarios, o cualquier combinación de los mismos. Preferiblemente, las células madre placentarias se obtienen a partir de un tejido placentario que comprende amnios y corion. Típicamente, las células madre placentarias se pueden obtener por rotura de un pequeño bloque de tejido placentario, *p. ej.*, un bloque de tejido placentario que tiene aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 600, 700, 800, 900 o aproximadamente 1000 milímetros cúbicos de volumen.

Una composición de recolección de células madre placentarias preferida comprende una o más enzimas de rotura de tejido. La digestión enzimática utiliza preferiblemente una combinación de enzimas, *p. ej.*, una combinación de una metaloproteasa de matriz y una proteasa neutra, por ejemplo, una combinación de colagenasa y dispasa. En una realización, la digestión enzimática de tejido placentario utiliza una combinación de una metaloproteasa de matriz, una proteasa neutra, y una enzima mucolítica para la digestión del ácido hialurónico, tal como una combinación de colagenasa, dispasa, y hialuronidasa o una combinación de Liberase (Boehringer Mannheim Corp., Indianápolis, Ind.) y hialuronidasa. Otras enzimas que se pueden utilizar para romper el tejido de la placenta incluyen papaína, desoxirribonucleasas, serina proteasas, tales como tripsina, quimotripsina, o elastasa. Las serina proteasas pueden ser inhibidas por la alfa 2 microglobulina en suero y por lo tanto el medio utilizado para la digestión está normalmente libre de suero. Comúnmente se utilizan EDTA y ADNasa en los procedimientos de digestión con enzimas para aumentar la eficacia de la recuperación celular. La digestasa se diluye preferiblemente con el fin de evitar atrapar las células madre dentro del producto digerido viscoso.

Se puede utilizar combinación de enzimas de digestión de tejido. Las concentraciones típicas para las enzimas de digestión de tejido incluyen, *p. ej.*, 50-200 U/mL para colagenasa I y colagenasa IV, 1-10 U/mL para dispasa, y 10-100 U/mL para elastasa. Las proteasas se pueden utilizar combinadas, esto es, dos o más proteasas en la misma reacción de digestión, o se pueden utilizar sucesivamente con el fin de liberar las células madre placentarias. Por ejemplo, en una realización, una placenta, o una parte de la misma, se digiere primero con una cantidad apropiada de colagenasa I a 2 mg/mL durante 30 minutos, seguido de la digestión con tripsina, 0,25%, durante 10 minutos, a 37°C. Las serina proteasas se utilizan preferiblemente consecutivamente después del uso de otras enzimas.

En otra realización, el tejido se puede romper adicionalmente mediante la adición de un quelante, *p. ej.*, ácido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA) o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) a la composición de recolección de células madre placentarias que comprende las células madre placentarias, o a una disolución en la que el tejido se rompe y/o digiere antes del aislamiento de las células madre placentarias con la composición de recolección de células madre placentarias.

Cuando una placenta completa, o porción de una placenta comprende células tanto fetales como maternas (por ejemplo, donde la porción de la placenta comprende el corion o cotiledones), las células madre placentarias recolectadas comprenderán una mezcla de células madre placentarias derivadas de fuentes tanto fetales como maternas. Cuando una porción de la placenta no comprende, o comprende un número insignificante de células maternas (por ejemplo, amnios), las células madre placentarias recogidas comprenderán casi exclusivamente células madre placentarias fetales.

6.6.1.1 Aislamiento y caracterización de células madre placentarias

Las células madre placentarias de mamífero, ya sea obtenidas por perfusión o digestión enzimática, pueden ser purificadas inicialmente a partir de (*es decir*, aisladas de otras células), *p. ej.*, mediante centrifugación en gradiente de Ficoll. Tal centrifugación puede seguir a cualquier protocolo convencional para la velocidad de centrifugación, etc. En una realización, por ejemplo, las células recogidas de la placenta se recuperan del producto perfundido por centrifugación a 5000 xg durante 15 minutos a temperatura ambiente, que separa las células de, *p. ej.*, residuos contaminantes y plaquetas. En otra realización, el producto perfundido placentario se concentra a aproximadamente 200 ml, se dispone en capas suavemente sobre Ficoll y se centrifuga a aproximadamente 1100 xg durante 20 minutos a 22°C, se recoge y la capa de células de la interfaz de baja densidad para su posterior procesamiento.

Los sedimentos celulares se pueden resuspender en la composición de recolección de células madre placentarias de nueva aportación, o un medio adecuado para el mantenimiento de células madre, *p. ej.*, medio libre de suero IMDM que contiene 2U/mL de heparina y EDTA 2 mM (GibcoBRL, NY). La fracción total de células mononucleares se puede aislar, *p. ej.*, utilizando Lymphoprep (Nycomed Pharma, Oslo, Noruega) de acuerdo con el procedimiento recomendado por el fabricante.

Según se utiliza en la presente memoria, "aislar" las células madre placentarias significa eliminar al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99% de las células con las que se asocian normalmente las células madre en la placenta de mamífero intacta. Una célula madre placentaria de un órgano está "aislada" cuando está presente en una población de células que comprende menos de 50% de las células con las que la célula madre placentaria se asocia normalmente en el órgano intacto.

Las células placentarias obtenidas mediante perfusión o digestión pueden, por ejemplo, ser adicionalmente, o inicialmente, aisladas mediante tripsinización diferencial utilizando, *p. ej.*, una disolución de tripsina al 0,05% con EDTA al 0,2% (Sigma, St. Louis MO). La tripsinización diferencial es posible debido a que las células madre placentarias normalmente se desprenden de las superficies de plástico en el plazo de aproximadamente cinco minutos, mientras que otras poblaciones adherentes requieren típicamente más de 20-30 minutos de incubación. Las células madre placentarias desprendidas se pueden cosechar después de tripsinización y neutralización con tripsina, utilizando, *p. ej.*, Tripsin Neutralizing Solution (TNS, Cambrex). En una realización de aislamiento de células adherentes, se colocan alícuotas de, por ejemplo, aproximadamente $5-10 \times 10^6$ células en cada uno de varios matraces T-75, preferiblemente matraces T75 recubiertos con fibronectina. En tal realización, las células pueden ser cultivadas con Medio de Crecimiento de Células Madre Mesenquimales (MSCGM en sus siglas inglesas) (Cambrex) disponible comercialmente, y se colocan en una incubadora de cultivo de tejidos (37°C, CO₂ al 5%). Después de 10 a 15 días, las células no adherentes se retiran de los matraces mediante lavado con PBS. El PBS se sustituye a continuación por MSCGM. Los matraces se examinan preferiblemente diariamente para determinar la presencia de diversos tipos de células adherentes y, en particular, para la identificación y la expansión de las agrupaciones de células fibroblastoides.

El número y tipo de células recogidas de una placenta de mamífero se pueden controlar, por ejemplo, midiendo los cambios en la morfología y los marcadores de la superficie celular utilizando técnicas de detección de células convencionales, tales como citometría de flujo, clasificación de células, inmunocitoquímica (*p. ej.*, tinción con anticuerpos específicos de tejidos o específicos de marcadores celulares), clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), clasificación celular activada magnéticamente (MACS), mediante el examen de la morfología de las células utilizando microscopía óptica o confocal, y/o midiendo los cambios en la expresión génica utilizando mecanismos bien conocidos en la técnica, tales como la PCR y perfilado de la expresión génica. Estos mecanismos se pueden utilizar, también, para identificar células que son positivas para uno o más marcadores concretos. Por ejemplo, utilizando anticuerpos frente a CD34, se puede determinar, utilizando los mecanismos anteriormente, si una célula comprende una cantidad detectable de CD34; si es así, la célula es CD34⁺. Del mismo modo, si una célula produce suficiente ARN de OCT-4 para ser detectable mediante RT-PCR, o significativamente más ARN de OCT-4 que una célula adulta, la célula es OCT-4⁺. Los anticuerpos contra marcadores de superficie celular (*p. ej.*, marcadores CD tales como CD34) y la secuencia de genes específicos de células madre placentarias, tales como OCT-4, son bien conocidos en la técnica.

Las células madre placentarias, concretamente las células que se han aislado mediante separación con Ficoll, adherencia diferencial, o una combinación de ambas, se pueden clasificar utilizando un clasificador de células activado por fluorescencia (FACS). La clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) es un método bien conocido para la separación de partículas, incluyendo células, basado en las propiedades fluorescentes de las partículas (Kamarch, 1987, *Methods Enzymol*, 151:150-165). La excitación con láser de los radicales fluorescentes en las partículas individuales da como resultado una pequeña carga eléctrica que permite la separación electromagnética de partículas positivas y negativas de una mezcla. En una realización, los anticuerpos específicos de marcador de la superficie celular o ligandos se marcan con distintas marcas fluorescentes. Las células se procesan a través del clasificador celular, que permite la separación de las células en función de su capacidad para unirse a los anticuerpos utilizados. Las partículas clasificadas mediante FACS se pueden depositar directamente en pocillos individuales de placas de 96 pocillos o de 384 pocillos para facilitar la separación y la clonación.

En un esquema de clasificación, las células madre placentarias se clasifican basándose en la expresión de los marcadores CD34, CD38, CD44, CD45, CD73, CD105, OCT-4 y/o HLA-G. Esto se puede lograr en relación con los procedimientos para seleccionar células madre placentarias basándose en sus propiedades de adherencia en cultivo. Por ejemplo, se puede realizar un tronco de selección mediante adherencia antes o después de la clasificación basándose en la expresión del marcador. En una realización, por ejemplo, las células se clasifican primero basándose en su expresión de CD34; las células CD34⁻ se retienen, y las células que son CD200⁺ HLA-G⁺, se separan del resto de las células CD34⁻. En otra realización, las células placentarias se basan en su expresión de marcadores CD200 y/o HLA-G; por ejemplo, las células que presentan cualquiera de estos marcadores se aíslan para su uso adicional. Las células que expresan, *p. ej.*, CD200 y/o HLA-G pueden, en una realización específica, clasificarse adicionalmente basándose en su expresión de CD73 y/o CD105, o epítopos reconocidos por los anticuerpos SH2, SH3 o SH4, o falta de expresión de CD34, CD38 o CD45. Por ejemplo, en una realización, las células placentarias se clasifican por la expresión, o la carencia de la misma, de CD200, HLA-G, CD73, CD105, CD34, CD38 y CD45, y las células placentarias que son CD200⁺, HLA-G⁺, CD73⁺, CD105⁺, CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻ se aíslan de otras células placentarias para su uso adicional.

En otra realización, se pueden utilizar cuentas magnéticas para separar las células. Las células se pueden clasificar utilizando una técnica de clasificación celular activada magnéticamente (MACS), un método para separar las partículas basándose en su capacidad para unirse a cuentas magnéticas (0,5-100 m de diámetro). Se pueden llevar

a cabo una variedad de modificaciones útiles en las microsferas magnéticas, incluyendo la adición covalente de anticuerpo que reconoce específicamente una molécula de la superficie celular concreta o un hapteno. Las cuentas se mezclan a continuación con las células para permitir la unión. Después las células se hacen pasar a través de un campo magnético para separar las células que tienen el marcador de superficie celular específico. En una realización, estas células se pueden aislar y volver a mezclar a continuación con cuentas magnéticas acopladas a un anticuerpo contra marcadores de la superficie celular adicionales. De nuevo las células se hacen pasar a través de un campo magnético, aislando las células que se unen a ambos anticuerpos. Tales células se pueden diluir a continuación en placas separadas, tales como placas de microtitulación para el aislamiento clonal.

Las células madre placentarias también se pueden caracterizar y/o clasificar basándose en las características de morfología y crecimiento celulares. Por ejemplo, las células madre placentarias se pueden caracterizar por tener, y/o seleccionar basándose en, *p. ej.*, una apariencia fibroblastoide en cultivo. Las células madre placentarias también se pueden caracterizar por tener, y/o seleccionar, basándose en su capacidad para formar cuerpos de tipo embrioide. En una realización, por ejemplo, las células placentarias que son de forma fibroblastoide, expresan CD73 y CD105, y producen uno o más cuerpos de tipo embrioide en cultivo se aíslan de otras células placentarias. En otra realización, las células placentarias OCT-4⁺ que producen uno o más cuerpos de tipo embrioide en cultivo se aíslan de otras células placentarias.

En otra realización, las células madre placentarias se pueden identificar y caracterizar por medio de un análisis de las unidades formadoras de colonias. Los análisis de las unidades formadoras de colonias son comúnmente conocidos en la técnica, tales como el medio MESENCULT™ (Stem Cell Technologies, Inc., Vancouver, Columbia británica)

Las células madre placentarias se pueden evaluar para determinar la viabilidad, el potencial de proliferación, y la longevidad utilizando mecanismos convencionales conocidos en la técnica, tales como el análisis de exclusión con azul tripán, el análisis de absorción de diacetato de fluoresceína, el análisis de absorción de yoduro de propidio (para evaluar la viabilidad); y el análisis de absorción de timidina, el análisis de proliferación celular MTT (para evaluar la proliferación). La longevidad se puede determinar mediante métodos bien conocidos en la técnica, tales como la determinación del número máximo de duplicación de la población en un cultivo ampliado.

Las células madre placentarias también se pueden separar de otras células placentarias utilizando otros mecanismos conocidos en la técnica, *p. ej.*, crecimiento selectivo de células deseadas (selección positiva), destrucción selectiva de células no deseadas (selección negativa); separación basada en la aglutinabilidad celular diferencial en la población mixta como, por ejemplo, con aglutinina de soja; procedimientos de congelación y descongelación; filtración; centrifugación convencional y zonal; elutriación centrífuga (centrifugación contra-corriente); separación por gravedad unitaria; distribución en contracorriente; electroforesis; y similares.

6.6.1.2 Cultivo de células madre placentarias

Las células madre placentarias se pueden aislar como se describe más arriba y poner en contacto inmediatamente con una composición de la invención. Las células madre placentarias también se pueden cultivar, *p. ej.*, en cultivo celular, durante varias generaciones antes de ponerlas en contacto con la composición de la invención. Por ejemplo, las células madre placentarias aisladas, o la población de células madre placentarias, o las células o el tejido placentario a partir de los cuales se hacen crecer las células madre placentarias, se puede utilizar para iniciar, o sembrar, cultivos celulares. Las células se transfieren generalmente a recipientes de cultivo de tejidos estériles o bien sin recubrir o bien recubiertos con matriz extracelular o ligandos tales como laminina, colágeno (*p. ej.*, nativo o desnaturalizado, gelatina, fibronectina, ornitina, vitronectina y proteína de membrana extracelular) (*p. ej.*, Matrigel® (BD Discovery Labware, Bedford, Mass.)).

En realizaciones preferidas, las células madre placentarias se cultivan sobre una composición de colágeno de la presente invención. En ciertas realizaciones, la composición de colágeno comprende cantidades detectables de fibronectina y laminina. En otras realizaciones, la composición de colágeno comprende una cantidad no detectable de fibronectina o laminina. En otras realizaciones, la composición de colágeno comprende al menos aproximadamente 5%, o al menos aproximadamente 10%, en peso seco de elastina. En otra realización, la composición de colágeno comprende no más de aproximadamente 5% en peso seco de elastina.

En ciertas realizaciones, las células madre placentarias se cultivan para la producción de citoquinas específicas que son recolectables del medio de cultivo. En realizaciones específicas, la citoquina es IL-6, IL-8, y/o proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1). En otras ciertas realizaciones, las células madre placentarias se cultivan para la producción de fibronectina. En una realización específica, las células madre placentarias se cultivan sobre una composición de la invención que comprende menos de aproximadamente 5% de fibronectina.

Como se ha señalado anteriormente, las composiciones de colágeno placentario de la invención se pueden conformar en cualquier forma que sea útil, *p. ej.*, médicamente útil. Estas composiciones, una vez conformadas y secas, son estables en disolución acuosa, *p. ej.*, medio de cultivo tisular o tampón. De este modo, las células madre placentarias, se pueden cultivar directamente sobre las composiciones conformadas. Tal cultivo se puede realizar en placas de cultivo celular u otros recipientes de líquidos, *p. ej.*, matraces, adecuados para el cultivo celular.

Las células madre placentarias se pueden cultivar en cualquier medio, y en cualquiera de las condiciones, reconocidos en la técnica como aceptables para el cultivo de células madre, excluyendo células de origen embrionario humano. Preferiblemente, el medio de cultivo comprende suero. Las células madre placentarias se pueden cultivar, por ejemplo, en DMEM-LG (medio esencial modificado de Dulbecco, con bajo nivel de glucosa)/MCDB 201 (medio basal de fibroblastos de pollo) que contiene ITS (insulina-transferrina-selenio), LA + BSA (ácido linoleico-albúmina de suero bovino), dextrosa, ácido L-ascórbico, PDGF, EGF, IGF-1, y penicilina/estreptomicina; DMEM-HG (alto contenido de glucosa) que comprende suero bovino fetal al 10% (FBS); DMEM-HG que comprende SFB al 15%; IMDM (medio de Dulbecco modificado de Iscove) que comprende FBS al 10%, suero de caballo al 10%, e hidrocortisona; M199 que comprende FBS al 10%, EGF, y heparina; γ -MEM (medio esencial mínimo) que comprende FBS al 10%, GLUTAMAX™ y gentamicina; DMEM que comprende FBS al 10%, GLUTAMAX™ y gentamicina, etc. Un medio preferido es DMEM-LG/MCDB-201 que comprende FBS al 2%, ITS, LA + BSA, dextrosa, ácido L-ascórbico, PDGF, EGF, y penicilina/estreptomicina.

Otros medios que se pueden utilizar para cultivar células madre placentarias incluyen DMEM (con alto o bajo contenido de glucosa), medio basal de Eagle, medio F10 de Ham (F10), medio F-12 de Ham (F12), medio de Dulbecco modificado de Iscove, Medio de Crecimiento de Células Madre Mesenquimales (MSCGM), medio L-15 de Liebovitz, MCDB, DMEM/F12, RPMI 1640, DMEM avanzado (Gibco), DMEM/MCDB201 (Sigma), y CELL-GRO FREE.

El medio de cultivo puede tener un suplemento de uno o más componentes incluyendo, por ejemplo, suero (*p. ej.*, suero bovino fetal (FBS), preferiblemente aproximadamente 2-15% (v/v); suero equino (caballo) (ES); suero humano (HS)); betamercaptoetanol (BME), preferiblemente aproximadamente al 0,001% (v/v); uno o más factores de crecimiento, por ejemplo, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento de tipo insulínico 1 (IGF-1), factor inhibidor de la leucemia (LIF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), y eritropoyetina (EPO); aminoácidos, incluyendo L-valina; y uno o más antibióticos y/o agentes antimicóticos para controlar la contaminación microbiana, tales como, por ejemplo, penicilina G, sulfato de estreptomicina, anfotericina B, gentamicina y nistatina, ya sea solos o combinados.

Las células madre placentarias se pueden cultivar en condiciones de cultivo de tejidos convencionales, *p. ej.*, en placas de cultivo de tejidos o placas de múltiples pocillos. Las células madre placentarias también se pueden cultivar utilizando el método de la gota colgante. En este método, las células madre placentarias se suspenden a aproximadamente 1×10^4 células por mL en aproximadamente 5 mL de medio, y una o más gotas del medio se colocan en el interior de la tapa de un recipiente de cultivo de tejidos, *p. ej.*, una placa de Petri de 100 mL. Las gotas pueden ser, *p. ej.*, gotas individuales o gotas múltiples, *p. ej.*, de un pipeteador multicanal. La tapa se invierte y se coloca cuidadosamente en la parte superior de la parte inferior de la placa, que contiene un volumen de líquido, *p. ej.*, PBS estéril suficiente para mantener el contenido de humedad en la atmósfera de la placa, y las células madre placentarias se cultivan.

Una vez aislada la célula madre placentaria o la población de células madre placentarias se pueden hacer proliferar y expandir *in vitro*. Por ejemplo, una población de células madre placentarias se puede cultivar en recipientes de cultivo de tejidos, *p. ej.*, bandejas, matraces, placas de múltiples pocillos, durante un tiempo suficiente para que las células madre placentarias proliferen hasta una confluencia de 70-90%, es decir, hasta que las células madre placentarias y su progenie ocupan 70-90% del área de superficie de cultivo del recipiente para el cultivo de tejidos.

Las células madre placentarias se pueden sembrar en vasijas de cultivo a una densidad que permita el crecimiento celular. Por ejemplo, las células se pueden sembrar de una baja densidad (*p. ej.*, de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000 células/cm²) a una alta densidad (*p. ej.*, aproximadamente 50.000 o más células/cm²). En una realización preferida, las células se cultivan de aproximadamente 0 a aproximadamente 5 por ciento en volumen de CO₂ en aire. En algunas realizaciones preferidas, las células se cultivan de aproximadamente 2 a aproximadamente 25 por ciento de O₂ en aire, preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 por ciento de O₂ en aire. Las células se cultivan preferiblemente de aproximadamente 25°C a aproximadamente 40°C, preferiblemente a 37°C. Las células se cultivan preferiblemente en una incubadora. El medio de cultivo puede ser estático o agitado, por ejemplo, utilizando un biorreactor. Las células madre placentarias se cultivan preferiblemente con estrés oxidativo bajo (*p. ej.*, con la adición de glutatión, ácido ascórbico, catalasa, tocoferol, N-acetilcisteína, o similares).

Una vez que se obtiene una confluencia de 70%-90%, las células se pueden hacer pasar. Por ejemplo, las células se pueden tratar enzimáticamente, *p. ej.*, tripsinizar, utilizando mecanismos bien conocidos en la técnica, para separarlas de la superficie de cultivo de tejidos. Después de retirar las células mediante pipeteo y contar las células, se hacen pasar aproximadamente 20.000-100.000 células madre, preferiblemente aproximadamente 50.000 células madre, a un nuevo recipiente de cultivo que contiene medio de cultivo de nueva aportación. Típicamente, el nuevo medio es el mismo tipo de medio del cual se eliminaron las células madre. Las células madre placentarias que se han hecho pasar al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, o 20 veces, o más, se pueden utilizar combinadas con las composiciones de colágeno de la invención.

6.6.2. Células no madre

La composición de la invención, que comprende células madre placentarias, puede, en ciertas realizaciones, comprender también uno o más tipos de células no madre. Según se utiliza en la presente memoria, "células no madre" indica una célula terminalmente diferenciada. Por ejemplo, en una realización, la composición de la invención comprende una pluralidad de células madre placentarias y una pluralidad de fibroblastos. Las células no madre que se pueden incluir en las composiciones de la invención incluyen: fibroblastos o células de tipo fibroblasto; células endoteliales, células epiteliales, células musculares, células cardíacas, células pancreáticas; y similares. En ciertas otras realizaciones, la composición comprende al menos dos tipos de células madre y al menos dos tipos de células no madre.

6.7 Métodos de uso de las composiciones de colágeno

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona métodos de uso de las composiciones de colágeno de la invención terapéuticamente, profilácticamente o cosméticamente.

Las composiciones de colágeno de la presente invención tienen una amplia gama de usos potenciales. Los usos incluyen la fabricación de tejidos y órganos diseñados, incluyendo estructuras tales como parches o tapones de tejidos o material de matriz, prótesis y otros implantes, armazones para tejidos, reparación o vendaje de heridas, dispositivos hemostáticos, dispositivos para uso en la reparación y soporte de tejidos tales como suturas, tornillos quirúrgicos y ortopédicos, y placas de cirugía y ortopedia, revestimientos naturales o componentes para implantes sintéticos, implantes y soportes cosméticos y soportes de reparación o estructurales para órganos o tejidos, liberación de sustancias, plataformas de bioingeniería, plataformas para someter a ensayo el efecto de sustancias sobre células, cultivos celulares, y muchos otros usos. Además, aunque se proporcionan muchos ejemplos específicos a continuación referentes a la combinación de colágeno con otros materiales y/o sustancias específicas, se pueden utilizar muchas otras combinaciones de materiales y sustancias.

En aplicaciones en las que la composición de colágeno se va a utilizar para el tratamiento o el relleno de una herida, puede ser ventajoso para la composición estimular la producción de fibronectina por las células madre placentarias en los tejidos circundantes. En tal realización, la herida se puede poner en contacto con una composición de la invención que comprende una cantidad no detectable de fibronectina.

La capacidad para combinar las células en un material de colágeno proporciona la capacidad de utilizar las composiciones de la presente invención para construir tejidos, órganos, o tejidos de tipo órgano. Las células incluidas en tales tejidos u órganos pueden incluir células que cumplen la función de suministrar una sustancia, células sembradas que proporcionarán los inicios de tejido de reemplazo, o ambos. Se pueden utilizar muchos tipos de células para crear tejidos u órganos. Las células madre, excluyendo las células madre embrionarias humanas, células madre comprometidas, excluyendo las células madre embrionarias humanas, y/o células diferenciadas se utilizan en diversas realizaciones. Los ejemplos de las células madre utilizadas en estas realizaciones incluyen, células madre de médula ósea y células madre de cordón umbilical utilizadas para formar órganos o tejido de tipo órgano tales como hígados o riñones. En algunas realizaciones, la forma de la composición ayuda a enviar señales a las células para crecer y reproducirse en un tipo específico de forma deseada. Otras sustancias, por ejemplo inductores de diferenciación, se pueden añadir a la matriz para promover tipos específicos de crecimiento celular. Adicionalmente, se incorporan diferentes mezclas de tipos de células en la composición en algunas realizaciones. La capacidad para utilizar materiales y matrices de colágeno para obtener mediante bioingeniería tejidos u órganos crea una amplia variedad de aplicaciones de reemplazo del tejidos obtenidos mediante bioingeniería. Los ejemplos de los componentes obtenidos mediante bioingeniería incluyen hueso, estructuras dentales, articulaciones, cartílago, músculo esquelético, músculo liso, músculo cardíaco, tendones, meniscos, ligamentos, vasos sanguíneos, endoprótesis vasculares, válvulas para el corazón, córneas, tímpanos, guías nerviosas, parches o selladores de tejidos u órganos, relleno para pérdida de tejidos, láminas para reparaciones cosméticas, piel (láminas con células añadidas para elaborar un equivalente de la piel), estructuras de tejidos blandos de la garganta, tales como tráquea, epiglotis y cuerdas vocales, otras estructuras cartilaginosas como el cartílago nasal, tarsos, anillos traqueales, cartílago tiroideos y cartílago aritenoides, tejido conectivo, injertos vasculares y componentes de los mismos, y láminas para aplicaciones tópicas, y reparación o sustitución de órganos tales como hígados, riñones y páncreas. En algunas realizaciones, tales matrices se combinan con fármacos y matrices de liberación de sustancias de la presente invención en formas que mejoren la función del implante. Por ejemplo, se pueden añadir antibióticos, agentes anti-inflamatorios, anestésicos locales o combinaciones de los mismos, a la matriz de un órgano obtenido mediante bioingeniería para acelerar el procedimiento de curación y reducir el malestar.

6.7.1. Aplicaciones cosméticas

La piel humana es un material compuesto de la epidermis y la dermis. La capa más externa de la capa epidérmica de la piel es el estrato córneo. Debajo de la capa del estrato córneo está la epidermis. Debajo de la epidermis, está la capa más externa de la dermis llamada dermis papilar, seguida de la dermis reticular y la capa subcutánea.

La piel tiene muchas funciones, incluyendo la protección, la absorción, la pigmentogénesis, la percepción sensorial, la secreción, la excreción, la termorregulación y la regulación de los procesos inmunológicos. Estas funciones de la

piel se ven afectadas negativamente, por ejemplo, por el envejecimiento, la exposición excesiva al sol, el tabaquismo, el trauma, y/o factores ambientales, que causan cambios estructurales en la piel y pueden dar como resultado el deterioro de la función de barrera de la piel y una disminución del recambio de las células epidérmicas. El colágeno y la elastina dañados pierden la capacidad de contraerse adecuadamente, lo que da como resultado la formación de arrugas en la piel y rugosidad en la superficie. Las arrugas son modificaciones de la piel que normalmente se asocian con el envejecimiento cutáneo y se desarrollan preferiblemente en la piel expuesta al sol. A medida que el envejecimiento progresa, la cara, así como otras zonas del cuerpo comienzan a mostrar los efectos de la gravedad, la exposición al sol y años de, *p. ej.*, movimiento de los músculos faciales, tales como sonreír, masticar y cerrar los ojos. A medida que la piel envejece o se vuelve poco saludable, adquiere arrugas, descolgamientos y estrías, se vuelve áspera, y disminuye su capacidad para sintetizar Vitamina D. La piel envejecida también se vuelve más delgada y tiene una interfaz dermoepidérmica aplanada debido a las alteraciones en el colágeno, la elastina y los glicosaminoglicanos. Típicamente, la piel envejecida se puede caracterizar por la disminución del grosor, la elasticidad, y la adherencia al tejido subyacente.

El daño a la piel debido al envejecimiento, los factores ambientales, la exposición al sol y otros elementos, tales como la pérdida de peso, la maternidad, la enfermedad (*p. ej.*, acné y cáncer) y la cirugía a menudo da como resultado deficiencias en el contorno de la piel y otras anomalías de la piel. Con el fin de corregir las deficiencias del contorno y otras anomalías de la piel, las personas a menudo recurren a la cirugía estética, tal como estiramientos faciales y aplanamiento de los pliegues. La cirugía estética, sin embargo, es generalmente costosa, invasiva, y tiene el potencial de dejar cicatrices en las zonas de operación y puede afectar las funciones biológicas y fisiológicas normales. Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad de terapias alternativas.

La invención proporciona métodos para el aumento de la piel en un paciente. En una realización, un método para el aumento de la piel en un paciente comprende la inyección o la administración de otro modo de una composición de colágeno de la invención a una zona de la cara o el cuerpo de un paciente que necesite ser aumentada, en donde la zona de la cara o el cuerpo del paciente se ve aumentada en comparación con la zona antes de la administración del colágeno. El "aumento de la piel" en el contexto de la presente invención se refiere a cualquier cambio del estado natural de la piel de un paciente (*p. ej.*) de un ser humano y las zonas relacionadas, debido a actos o efectos externos. Las zonas no limitantes de la piel que se pueden cambiar mediante aumento de la piel incluyen la epidermis, la dermis, la capa subcutánea, la grasa, el músculo erector del pelo, el tallo piloso, el poro sudoriparo, las glándulas sebáceas, o una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, los métodos de la invención comprenden inyectar o administrar de otro modo una composición de colágeno de la invención a un paciente para su uso en el tratamiento de patas de gallo, pliegues nasolabiales ("líneas de la sonrisa"), líneas de marioneta, pliegues glabellares ("líneas de expresión"), o una combinación de los mismos. Una composición de colágeno de la invención puede ayudar a rellenar las líneas, pliegues y otras arrugas y restaurar una apariencia más uniforme, más joven. Se puede utilizar una composición de colágeno de la invención sola o junto con una o más composiciones inyectables, un procedimiento de rejuvenecimiento, tal como un tratamiento con láser o un procedimiento de remodelación, tal como un estiramiento facial.

En una realización, también se puede utilizar una composición de colágeno de la invención para aumentar las zonas plegadas o hundidas de la cara y/o para añadir o incrementar el contenido a las zonas de la cara y el cuerpo de un paciente. Las zonas de la cara y/o el cuerpo que requieren aumento pueden ser el resultado, *p. ej.*, de envejecimiento, trauma, enfermedad, dolencia, factores ambientales, pérdida de peso, parto o una combinación de los mismos. Los ejemplos de una zona de la cara o el cuerpo de un paciente, en los que se puede inyectar o administrar de otro modo una composición de colágeno de la invención incluyen la ojera, la sien, el malar superior, el malar inferior, el mentón, los labios, la mandíbula, la frente, el entrecejo, el ceño, la mejilla, la zona comprendida entre el labio superior y la nariz, la nariz (tal como el puente de la nariz), el cuello, las nalgas, las caderas, el esternón, o cualquier otra parte de la cara o el cuerpo, o una combinación de las mismas.

Una composición de colágeno de la invención se puede utilizar para tratar deficiencias de la piel incluyendo arrugas, depresiones u otros pliegues (*p. ej.*, líneas de expresión, líneas de preocupación, patas de gallo, líneas de marioneta), estrías, cicatrices internas y externas (tales como cicatrices resultantes de lesiones, heridas, accidentes, mordeduras o cirugía), o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, una composición de colágeno de la invención se puede utilizar para la corrección, por ejemplo, de ojos "hundidos", vasos visibles que da como resultado círculos oscuros, así como canales lagrimales visibles. Una composición de colágeno de la invención también se puede utilizar, por ejemplo, para la corrección de las ojeras después de la eliminación agresiva de almohadillas de grasa debajo de los ojos de la blefaroplastia inferior o corrección de la mejilla inferior después de la extracción agresiva o pérdida natural de grasa bucal. En una realización, una composición de colágeno de la invención se puede utilizar para corregir los resultados de la rinoplastia, injerto de piel u otras irregularidades inducidas quirúrgicamente, tales como indentaciones resultantes de la liposucción. En otras realizaciones, se puede utilizar una composición de colágeno de la invención para la corrección de cicatrices faciales o corporales (*p. ej.*, herida, cicatrices de varicela, o de acné). En algunas realizaciones, una composición de colágeno de la invención se inyecta o se administra de otro modo en un paciente para la remodelación facial. La remodelación facial que utiliza los métodos de la invención se puede completar en un paciente con la laxitud del cuello, o que tenga un rostro demacrado, cara larga, cara inferior pesada, cara asimétrica, cara regordeta, o que tenga una cara con atrofia grasa

localizada, una retrusión del tercio medio facial, ojos hundidos, y/o cualquiera de sus combinaciones.

En una realización, los métodos de la invención, comprenden inyectar o administrar de otro modo una composición de colágeno de la invención a un paciente para uso en el tratamiento de una deficiencia de la piel, tal como una deficiencia de la piel causada por una enfermedad o trastorno, tal como cáncer o acné. La deficiencia puede ser el resultado directo o indirecto de la enfermedad o trastorno. Por ejemplo, una deficiencia de la piel puede estar causada por una enfermedad o trastorno o puede estar causada por un tratamiento de una enfermedad o trastorno.

6.7.2. Aplicaciones no cosméticas

6.7.2.1 Rellenado de huecos

La invención proporciona composiciones para su uso en métodos para sellar, rellenar y/o tratar de otro modo un hueco en el cuerpo de un paciente. En algunas realizaciones, los métodos de la invención comprenden inyectar o administrar de otro modo una composición de colágeno de la invención a un paciente para rellenar un hueco en el cuerpo del paciente. Por ejemplo, una composición de colágeno se puede administrar al paciente en la zona donde se encuentra el hueco. Se pretende que el término "hueco" incluya cualquier espacio hueco no deseable creado por envejecimiento, enfermedad, cirugía, anomalías congénitas, o una combinación de los mismos. Por ejemplo, se puede crear un hueco después de la eliminación quirúrgica de un tumor u otra masa del cuerpo de un paciente. Los ejemplos de los huecos que se pueden rellenar con una composición de colágeno de la invención incluyen una fisura, fistula, divertículo, aneurisma, quiste, lesión, o cualquier otro espacio hueco no deseable en cualquier órgano o tejido del cuerpo del paciente.

En algunas realizaciones, se puede utilizar una composición de colágeno de la invención para rellenar, sellar y/o tratar de otro modo, en su totalidad o en parte, una grieta, fisura, o fistula dentro de un tejido, órgano, u otra estructura del cuerpo (p. ej., un vaso sanguíneo), o coyunturas entre tejidos adyacentes, órganos o estructuras, para prevenir la fuga de fluidos biológicos, tales como sangre, orina, u otros fluidos biológicos. Por ejemplo, una composición de colágeno de la invención se puede inyectar, implantar, ensartar, o administrar de otro modo en una fisura entre vísceras, o en la abertura u orificio de una víscera al exterior del cuerpo del paciente. Una composición de colágeno de la invención se puede utilizar para llenar un hueco u otro defecto formado por estos estados patológicos y estimular la infiltración de fibroblastos, la curación y el crecimiento interno de tejido.

En una realización, se utiliza una composición para el uso de la invención para rellenar, sellar y/o tratar de otro modo una fisura en un paciente que necesite tratamiento, comprendiendo dicho uso inyectar o administrar de otro modo al paciente una composición de colágeno de la invención. Una composición de colágeno de la invención se va a administrar al paciente mediante inyección a través de una aguja en uno de los orificios fistulares y rellenando la mayoría o la totalidad de las ramas del orificio. Alternativamente, se pueden ensartar cuerdas o varillas de los colágenos en las lesiones de la fisuras a través de un orificio, o el colágeno se pueden introducir en el paciente con un catéter. Se pueden rellenar, sellar y/o tratar de otro modo varios tipos de fisuras por medio de una composición de colágeno de la invención, tales como fisuras anales, arteriovenosas, de la vejiga, carótido-cavernosas, externas, gástricas, intestinales, parietales, salivares, vaginales, y anorrectales, o una combinación de las mismas.

En una realización, la composición para el uso de la invención se utiliza para rellenar, sellar y/o tratar de otro modo un divertículo en un paciente que necesite tratamiento, comprendiendo dicho método inyectar o administrar de otro modo al paciente una composición de colágeno de la invención. Los divertículos son estructuras fisiológicas anormales que son bolsas o aberturas de saco de un órgano tubular o sacular, tal como el intestino, la vejiga, y se pueden rellenar o aumentar utilizando una composición de colágeno de la invención.

En otra realización, una composición para el uso de la invención se utiliza para rellenar, sellar y/o tratar de otro modo un quiste en un paciente que necesite tratamiento, comprendiendo dicho método inyectar o administrar de otro modo al paciente una composición de colágeno de la invención. Los quistes son sacos anormales que tienen un revestimiento de membrana que contiene material gaseoso, líquido o semisólido. En algunas realizaciones, el quiste es un pseudoquiste, que tiene una acumulación, p. ej., de líquido, pero no comprende un revestimiento epitelial u otro revestimiento membranoso. Los ejemplos no limitantes adicionales de quistes que se pueden rellenar, sellar y/o tratar de otro modo por medio de la invención incluyen quistes sebáceos, dermoides, óseos o serosos, o una combinación de los mismos.

En otra realización, una composición para el uso de la invención comprende inyectar o administrar de otro modo una composición de colágeno de la invención para rellenar en su totalidad, o en parte, cualquier huecos creado como resultado de la eliminación quirúrgica, química o biológica de crecimientos, fluidos, células, o tejidos innecesarios o indeseables de un paciente. Una composición de colágeno se puede inyectar localmente o administrar de otro modo en el sitio del hueco con el fin de aumentar el tejido restante y circundante, ayudar al procedimiento de curación, y minimizar el riesgo de infección. Este aumento es especialmente útil para los sitios huecos creados después de la escisión de un tumor, tal como después de la cirugía del cáncer de mama, la cirugía para la eliminación de tejido conectivo tumoral, tejidos óseos o tejido cartilaginoso.

La presente invención proporciona adicionalmente composiciones para su uso para provocar el aumento mediante la inyección o administración de otro modo de una composición de colágeno de la invención no directamente en el

cuerpo, sino de forma extracorpórea en órganos, componentes de órganos, o tejidos antes de la inclusión de dichos tejidos, órganos o componentes de los órganos en el cuerpo.

6.7.2.2 Voluminización tisular

5 En una realización, las composiciones para el uso de la invención comprenden administrar una composición de colágeno de la invención a un paciente para la voluminización tisular. "Voluminización tisular" en el contexto de la presente invención se refiere a cualquier cambio del estado natural de tejidos blandos no dérmicos de un paciente (*p. ej.*, de un ser humano) debido a actos o efectos externos. Los tejidos abarcados por la invención incluyen tejidos musculares, tejidos conectivos, grasas, y, tejidos nerviosos. Los tejidos abarcados por la presente invención pueden ser parte de muchos órganos o partes del cuerpo incluyendo el esfínter, el esfínter de la vejiga y la uretra.

10 6.7.2.3 Incontinencia Urinaria

La incontinencia urinaria (incluyendo la incontinencia urinaria de esfuerzo) es la pérdida repentina de orina que se produce con actividades que dan lugar a un aumento de la presión intraabdominal, tales como toser, estornudar, reír o hacer ejercicio. Durante estas actividades, la presión intra-abdominal se eleva transitoriamente por encima de la resistencia uretral, lo que da como resultado de este modo una repentina, suele ser pequeña, cantidad de pérdida de orina. La incontinencia por esfuerzo es generalmente un problema de almacenamiento de la vejiga en el que disminuye la resistencia del esfínter uretral y el esfínter no es capaz de prevenir el flujo de orina cuando hay aumento de la presión desde el abdomen. La incontinencia urinaria puede ocurrir como resultado de la debilitación de los músculos pélvicos que soportan la vejiga y la uretra, o debido a un mal funcionamiento del esfínter uretral. Por ejemplo, un trauma previo de la zona de la uretra, una lesión neurológica, y algunas medicaciones pueden debilitar la uretra. La incontinencia urinaria es más frecuente en las mujeres después de la menopausia, cirugía pélvica, o después tener hijos, *p. ej.*, después de múltiples embarazos y partos vaginales, o que tienen un prolapso pélvico (protrusión de la vejiga, la uretra o la pared rectal en el espacio vaginal), con cistocele, cistourethrocele, o rectocele), y normalmente se relaciona con una pérdida de soporte vaginal anterior. En los hombres, la incontinencia urinaria se puede observar después de la cirugía prostática, muy comúnmente prostatectomía radical, en la que puede haber una lesión en el esfínter uretral externo.

La invención incluye una composición para uso en la gestión o el tratamiento de la incontinencia urinaria, o un síntoma o afección resultante de la misma, que comprende inyectar o administrar de otro modo una composición de colágeno de la invención a un paciente que lo necesite, en donde se aumenta el tejido del esfínter del paciente y se mejora o se restaura la continencia en el paciente. La composición de colágeno se puede inyectar o administrar de otro modo periuretralmente para aumentar el volumen tisular en torno a la uretra para la gestión y/o el tratamiento de la incontinencia urinaria. La mejora en la incontinencia por esfuerzo se puede lograr aumentando volumen tisular e incrementando de ese modo la resistencia a la salida de la orina.

En algunas realizaciones, una composición de colágeno de la invención se inyecta o se administra de otro modo a un paciente en la zona en torno a la uretra, por ejemplo, para cerrar un agujero en la uretra a través del cual la orina se escapa hacia fuera o para reforzar el grosor de la pared de la uretra de manera que se selle herméticamente cuando la orina se ve frenada,

En otra realización, una composición de colágeno de la invención se inyecta o se administra de otro modo a un paciente en torno a la uretra inmediatamente fuera del músculo de la uretra en la salida de la vejiga. La inyección del material voluminizador se puede hacer a través de la piel, a través de la uretra, o, en las mujeres, a través de la vagina.

45 Cuando se utilizan agujas para la inyección de las composiciones de colágeno de la invención, la colocación de la aguja puede estar guiada por el uso de un cistoscopio insertado en la uretra. Los procedimientos de voluminización uretral se puede realizar bajo anestesia local, pero algunos pacientes pueden requerir una anestesia general, regional o raquídea. Se puede utilizar un anestésico local para que el paciente se pueda incorporar después de la inyección, y se puede determinar si se ha logrado la continencia. Si la continencia no ha sido restaurada, se puede administrar al paciente una o más inyecciones subsiguientes. Puede ser necesario repetir el procedimiento al cabo de unos pocos meses para lograr el control de la vejiga. La inyección de colágeno ayuda a controlar la pérdida de orina voluminizando la zona alrededor de la uretra, comprimiendo de ese modo el esfínter.

6.7.2.4 Reflujo vesicoureteral

50 El reflujo vesicoureteral (RVU) (o reflujo urinario) se caracteriza por el flujo retrógrado de la orina desde la vejiga hacia los riñones. Si no se trata el RVU puede causar efectos devastadores a largo plazo sobre la función renal y la salud general del paciente. Un paciente con RVU tiene un mayor riesgo de desarrollar una infección del tracto urinario, cicatrices renales, pielonefritis, hipertensión e insuficiencia renal progresiva.

La invención proporciona una composición para su uso en la gestión o tratamiento del RVU, o un síntoma o afección resultante del mismo, que comprende inyectar o administrar de otro modo a un paciente que lo necesite una composición de colágeno de la invención, en donde la pared ureteral del paciente se aumenta, y los síntomas de RVU se reducen o se eliminan. La composición de colágeno se puede inyectar (*p. ej.*, una inyección subtrigonal) o

administrar de otro modo, tal como bajo guía endoscópica, en el apoyo del detrusor bajo el orificio ureteral utilizando cualquier método conocido por los expertos en la técnica.

6.7.2.5 Enfermedad por reflujo gastroesofágico

5 La enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE) es un trastorno que generalmente se debe a que el esfínter esofágico inferior (EEI) - la válvula muscular donde el esófago se une al estómago - no se cierra correctamente, se relaja o debilita, y el contenido del estómago retrocede, o experimenta reflujo, al esófago. Cuando el ácido del estómago, u ocasionalmente sales biliares, entran en contacto con el esófago, esto causa la sensación de ardor de la acidez estomacal que la mayoría de nosotros hemos sentido de vez en cuando. Cuando el ácido del estómago experimenta reflujo entra en contacto con el revestimiento del esófago, causa una sensación de ardor en el pecho o la garganta (ardor de estómago), y el líquido se puede degustar en la parte posterior de la boca (indigestión ácida).
10 Con el tiempo, el reflujo del ácido estomacal daña el tejido que recubre el esófago, causando inflamación y dolor. En adultos, la ERGE de larga duración, no tratada puede conducir a un daño permanente del esófago ya veces incluso cáncer. Cualquier persona, incluyendo bebés, niños y mujeres embarazadas, puede tener ERGE.

15 La invención proporciona una composición para su uso en la gestión o el tratamiento del ERGE, o un síntoma o afección resultante del mismo, que comprende inyectar o administrar de otro modo a un paciente que lo necesite una composición de colágeno de la invención, en donde EEI del paciente se aumenta, y se reducen o eliminan los síntomas de ERGE. En algunas realizaciones, la composición de colágeno se administra bajo guía endoscópica en la pared del esófago a nivel de la unión esofagogástrica. Para obstaculizar el reflujo, el efecto voluminizador resulta de una combinación de material retenido y la consiguiente respuesta tisular. Una composición de colágeno de la
20 invención se puede inyectar a través de agujas para inyectables ánima convencional o grande (*p. ej.*, de gran calibre).

6.7.2.6 Cuerdas vocales y laringe

25 La invención proporciona una composición para su uso en la gestión o tratamiento de una enfermedad, trastorno (por ejemplo, un trastorno neurológico), o cualquier otra anomalía que afecte a una o ambas cuerdas vocales (pliegues) y/o la laringe (caja de voz). Los ejemplos no limitantes de tales enfermedades, trastornos u otras anomalías de la laringe y las cuerdas vocales son la incompetencia glótica, la parálisis unilateral de las cuerdas vocales, la parálisis bilateral de cuerdas vocales, la disfonía paralítica, la disfonía no paralítica, la disfonía espasmódica o una combinación de las mismas. En otras realizaciones, las composiciones de la invención también se pueden utilizar para gestionar o tratar enfermedades, trastornos u otras anomalías que dan como resultado el
30 cierre inapropiado de las cuerdas vocales, tal como una parálisis incompleta de la cuerda vocal ("paresia"), generalmente cuerdas vocales debilitadas, por ejemplo, con la edad avanzada ("presbilaringe"), y/o cicatrización de las cuerdas vocales (*p. ej.*, de una cirugía previa o radioterapia).

35 La invención incluye una composición para su uso que proporciona soporte o masa a un pliegue vocal en un paciente que carece de la masa (tal como en la flacidez o atrofia de las cuerdas vocales) o la movilidad (tal como en la parálisis) que una vez tuvo la cuerda vocal. En algunas realizaciones, las cuerdas vocales y/u otros tejidos blandos de la laringe se pueden aumentar con una composición de colágeno de la invención, ya sea sola o combinada con otros tratamientos o medicaciones. En una realización, una composición de colágeno de la invención aumenta o añade masa a uno (o ambos) pliegues vocales de modo que pueda hacer contacto con el otro pliegue vocal.

40 Se puede utilizar uno cualquiera de una serie de procedimientos bien conocidos por los en la técnica para la administración de una composición de colágeno de la invención a la cuerda o cuerdas vocales o la laringe de un paciente. En algunas realizaciones, se utiliza una aguja curva para inyectar una composición de colágeno de la invención a través de la boca del paciente. En otras realizaciones, se puede utilizar una aguja (tal como una aguja corta, de calibre superior) para inyectar una composición de colágeno de la invención directamente a través de la
45 piel y la nuez de Adán del paciente. Una composición de colágeno de la invención se puede administrar a un paciente a la vez que se controlan los pliegues vocales del paciente con un laringoscopio en una monitor de vídeo.

6.7.2.7 Incompetencia glótica

50 En una realización, la invención proporciona una composición para su uso en la gestión o el tratamiento de la incompetencia glótica. El aumento laríngeo percutáneo con colágeno se puede producir inyectando el colágeno de la invención utilizando una aguja en las cuerdas vocales de un paciente utilizando métodos conocidos en la técnica. En algunos casos, el paciente tiene hipofonía y/o incompetencia glótica que afectan a la función de voz de la laringe, aumento de rigidez muscular, y disminución de la capacidad para el movimiento del músculo tiroaritenoides. En otra realización, la hipofonía es un resultado de la Enfermedad de Parkinson. En una realización, una composición de la invención para su uso en la gestión o el tratamiento de la incompetencia glótica en un paciente que lo necesite
55 comprende inyectar o administrar de otro modo una composición de colágeno de la invención a las cuerdas vocales de un paciente, en donde la inyección aumenta la cuerda vocal y mejora cierre de la glotis, de tal manera que la incompetencia glótica se reduce o elimina en el paciente. El paciente puede tener o no cuerdas vocales móviles antes de la administración de una composición de colágeno de la invención.

6.7.2.8 Disfonía

La disfonía es cualquier alteración de la voz o dificultad para hablar. La disfonía puede estar asociada o no con parálisis laringea o de las cuerdas vocales. La invención proporciona composiciones para su uso en la gestión o el tratamiento de la disfonía, tales como la disfonía paralítica, la disfonía no paralítica o la disfonía espasmódica. En una realización, un método para gestionar o tratar la distonía en un paciente comprende inyectar o administrar una composición de colágeno de la invención al paciente que lo necesite, en donde la distonía del paciente mejora comparándola con la anterior a la administración de la composición de colágeno. En algunos casos, la inyección laringea de colágeno permite más medialización de uno o ambos pliegues vocales en pequeños incrementos para mejorar la fonación junto con o después de la tiroplastia de medialización.

6.7.2.9 Parálisis de las cuerdas vocales

La cuerda vocal es esencialmente un músculo recubierto con una membrana mucosa. Cuando el músculo ya no está conectado a un nervio, el músculo se atrofia. Por lo tanto, las cuerdas vocales paralizadas típicas son de pequeño tamaño y flácidas. Adicionalmente, dependiendo del tipo de parálisis, la cuerda vocal puede o no estar en movimiento lo suficientemente cerca del centro para la otra cuerda vocal para entrar en contacto con ella. Cuando las cuerdas vocales son incapaces de encontrarse, es difícil que el paciente realice un sonido (o, al menos, un sonido fuerte). Por lo tanto, la invención proporciona métodos para aumentar o abultar una cuerda vocal atrofiada en un paciente con parálisis de las cuerdas vocales, en donde se mejora la capacidad de las cuerdas vocales para unirse.

La parálisis del pliegue vocal unilateral es la inmovilidad de un pliegue de vocal, típicamente a causa de una disfunción nerviosa, y con frecuencia la laringe es incapaz de cerrarse completamente. El nervio laríngeo recurrente es el nervio principal que explica la mayor parte del movimiento de cada una de los pliegues vocales, y puede ser dañado, p. ej., por diversas enfermedades, ciertas cirugías o infección viral. En algunas realizaciones, la parálisis de las cuerdas vocales en un paciente es un síntoma o el resultado de un cáncer de tiroides, cáncer de pulmón, tuberculosis o sarcoidosis (o cualquier cosa que haga que los ganglios linfáticos se agranden en el pecho), accidente cerebrovascular, enfermedades neurológicas (p. ej., Charcot-Marie-Tooth, Shy-Drager, y atrofia multisistémica).

La parálisis bilateral de cuerdas vocales es la inmovilidad (normalmente cerca de la línea media) de ambos pliegues. En algunas realizaciones, la parálisis bilateral de los pliegues vocales en un paciente es un síntoma o resultado de, p. ej., accidente cerebrovascular u otra afección neurológica (tal como malformación de Arnold-Chiari), cáncer de tiroides, cirugía (tal como la cirugía mayor del cerebro) o tiroidectomía.

La invención proporciona composiciones para su uso en la gestión o tratamiento de la parálisis de las cuerdas vocales. En una realización, se proporciona un método para gestionar o tratar la parálisis unilateral o bilateral de las cuerdas vocales, o un síntoma relacionado con la misma en un paciente, que comprende inyectar o administrar de otro modo una composición de colágeno de la invención al paciente, en donde se mejora el cierre de los pliegues vocales en el paciente. En una realización, una composición de colágeno de la invención aumenta o agrega volumen a uno (o ambos) pliegues vocales paralizados de modo que pueda hacer contacto con el otro pliegue vocal. La inyección de una composición de colágeno de la invención al paciente que lo necesite puede ser a través de la boca del paciente o directamente a través de la piel y la nuez de Adán.

6.7.2.10 Liberación de fármacos

La composición de colágeno de la invención se puede utilizar como un vehículo de liberación de fármacos para la liberación controlada de un fármaco, p. ej., un agente terapéutico. En algunas realizaciones, la composición de colágeno libera los uno o más agentes terapéuticos en un sujeto, p. ej., un ser humano. Los agentes terapéuticos incluidos son proteínas, péptidos, polisacáridos, productos conjugados de polisacáridos, vacunas basadas en la genética, vacunas vivas atenuadas, células completas. Los ejemplos de los fármacos para uso en los métodos de la invención son antibióticos, agentes anticancerosos, agentes antibacterianos, agentes antivirales; vacunas; anestésicos; analgésicos; agentes antiasmáticos; agentes antiinflamatorios; antidepresivos; agentes antiartríticos; agentes antidiabéticos; antipsicóticos; estimulantes del sistema nervioso central; hormonas; inmunosupresores; relajantes musculares; prostaglandinas.

La composición de colágeno se puede usar como un vehículo de liberación para la liberación controlada de una o más moléculas pequeñas en un sujeto, p. ej., un ser humano. En algunas realizaciones, la composición de colágeno libera las una o más moléculas pequeñas en un sujeto, p. ej., un ser humano. Según se utiliza en la presente memoria, el término "molécula pequeña" y términos análogos, incluyen, péptidos, peptidomiméticos, aminoácidos, análogos de aminoácidos, polinucleótidos, análogos de polinucleótidos, nucleótidos, análogos de nucleótidos, compuestos orgánicos o inorgánicos (es decir, incluyendo compuestos heteroorgánicos y organometálicos) que tiene un peso molecular inferior a aproximadamente 10.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 5.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 1.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 500 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 100 gramos por mol, y sales, ésteres y otras

formas farmacéuticamente aceptables de tales compuestos. Las sales, ésteres y otras formas farmacéuticamente aceptables de tales compuestos también están incluidas.

En ciertas realizaciones, la composición de colágeno de la invención como vehículo para la liberación de fármacos da como resultado una absorción mejorada del fármaco, un perfil farmacocinético mejorado, y una distribución sistémica del fármaco con respecto a los otros sistemas de liberación de fármacos conocidos en la técnica. Por farmacocinética mejorada se quiere significar que se consigue una mejora del perfil farmacocinético medido, por ejemplo, mediante parámetros farmacocinéticos convencionales, tales como el tiempo para alcanzar la concentración máxima en plasma ($T_{m\acute{a}x}$); magnitud de la concentración máxima de plasma ($C_{m\acute{a}x}$); tiempo para lograr una concentración en sangre o plasma detectable (T_{lag}). Por absorción mejorada se quiere significar que la absorción del fármaco mejora medida por dichos parámetros. Las mediciones de los parámetros farmacocinéticos se llevan a cabo rutinariamente en la técnica.

En algunas realizaciones, las composiciones de colágeno de la invención comprenden adicionalmente una o más biomoléculas, *p. ej.*, agentes terapéuticos, incluyendo antibióticos, hormonas, factores de crecimiento, agentes antitumorales, agentes antifúngicos, agentes antivirales, medicaciones para el dolor, antihistamínicos, agentes antiinflamatorios, antiinfecciosos, agentes cicatrizantes de heridas, selladores de heridas, atrayentes celulares y reactivos para amazonas, enzimas, antagonistas o agonistas del receptores, hormonas, factores de crecimiento, médula ósea autógena u otros tipos de células, antibióticos, agentes antimicrobianos, y anticuerpos, o combinaciones de los mismos. En un ejemplo específico, las composiciones de colágeno de la invención se pueden impregnar con uno o más factores de crecimiento, por ejemplo, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento epitelial, *etc.* Las composiciones de colágeno de la invención también se pueden impregnar con una o más moléculas pequeñas, incluyendo moléculas orgánicas pequeñas tales como inhibidores específicos de procesos bioquímicos concretos *p. ej.*, inhibidores de receptores de membrana, hormonas, inhibidores de quinasa, inhibidores del crecimiento, fármacos contra el cáncer, antibióticos, *etc.*

En algunas realizaciones, las composiciones de colágeno de la invención se impregnan con una biomolécula, durante la producción o antes de la inyección en función de su uso previsto. En algunas realizaciones, las composiciones de colágeno de la invención comprenden uno o más interferones ($IFN-\alpha$, $IFN-\beta$, $IFN-\gamma$), factores estimuladores de colonias (CSF), factores estimuladores de colonias de granulocitos (GCSF), factores estimuladores de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factores de necrosis tumoral (TNF), factores de crecimiento nervioso (NGF), factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF) linfotoxinas, factores de crecimiento epidérmico (EGF), factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), factores de crecimiento de células endoteliales vasculares, eritropoyetina, factores de crecimiento transformantes (TGF), oncostatina M, interleuquinas (IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, *etc.*), miembros de sus familias, o sus combinaciones. En algunas realizaciones, la composición de colágeno de la invención comprende análogos, fragmentos, o derivados biológicamente activos de tales factores de crecimiento u otras biomoléculas.

Agentes activos concretos para uso en los métodos de la presente invención incluyen factores de crecimiento, tales como factores de crecimiento transformante (TGF), factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF), factores de crecimiento epidérmico (EGF), péptidos activados de tejido conjuntivo (CTAP), factores osteogénicos y análogos, fragmentos, y derivados biológicamente activos de tales factores de crecimiento. Los miembros de la familia de supergenes del factor de crecimiento transformante (TGF), que son proteínas reguladoras multifuncionales, son útiles. Los miembros de la familia de supergenes de TGF incluyen los factores de crecimiento transformante beta (por ejemplo, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3); proteínas morfogenéticas óseas (por ejemplo, BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8, BMP-9); factores de crecimiento de unión a heparina (por ejemplo, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de tipo insulínico (IGF)); inhibinas (por ejemplo, inhibina A, inhibina B); factores de diferenciación del crecimiento (por ejemplo, GDF-1); y activinas (por ejemplo, activina A, activina B, activina AB).

6.7.2.11 Heridas y quemaduras

Se espera que la composición de colágeno de la invención tenga una utilidad clínica mejorada como apósito para heridas, para aumentar o reemplazar la reparación de tejido duro y/o blando, en comparación con otros biomateriales conocidos en la técnica, *p. ej.*, los descritos en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 3.157.524; 4.320.201; 3.800.792; 4.837.285; 5.116.620, debido en parte a sus propiedades físicas. Debido a que la composición de colágeno de la invención conserva la estructura cuaternaria nativa del colágeno proporciona un mejor crecimiento interno del tejido a través de la migración de células a los intersticios de la matriz de colágeno. La composición de colágeno de la invención permite que las células se adhieran y se desarrollen en la matriz de colágeno, y sinteticen su propia macromoléculas. Las células producen de este modo una nueva matriz que permite el crecimiento de tejido nuevo. Tal desarrollo celular no se observa en otras formas conocidas de colágeno tales como fibras, vellones y colágeno soluble.

En algunas realizaciones, la invención incluye el uso en el tratamiento de una herida mediante la colocación de la composición de colágeno de la invención directamente sobre la piel del sujeto, es decir, sobre estrato córneo, sobre

el sitio de la herida, de modo que la herida se cubre, por ejemplo, utilizando una cinta adhesiva. En otras realizaciones, la invención incluye el tratamiento de una herida utilizando la composición de colágeno de la invención como un implante, *p. ej.*, como un implante subcutáneo.

5 La invención incluye la mejora de la tasa de cicatrización de heridas mediante la adición de una macromolécula capaz de promover el crecimiento interno del tejido de la composición de colágeno de la invención. Tales macromoléculas incluyen ácido hialurónico, fibronectina, laminina, y proteoglicanos (*Véanse, p. ej.*, Doillon et al. (1987) *Biomaterials* 8:195 200; y Doillon y Silver (1986) *Biomateriales* 7:3 8).

10 En algunas realizaciones, la composición de colágeno de la invención se utiliza para el tratamiento de heridas, incluyendo heridas de espesor parcial y completo, úlceras por presión, úlceras por presión, úlceras venosas, úlceras diabéticas, úlceras vasculares crónicas, heridas tunelizadas/socavadas, heridas quirúrgicas (*p. ej.*, sitios de donantes/injertos, post-cirugía de Mohs, post-cirugía láser, podología, dehiscencia de la herida), heridas por trauma (*p. ej.*, abrasiones, laceraciones, quemaduras de segundo grado, y desgarros de la piel) y heridas de drenaje. En ciertas realizaciones, la composición de colágeno de la invención está destinada a un solo uso.

15 La invención incluye adicionalmente la incorporación de agentes farmacológicamente activos incluyendo el factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento de tipo insulínico, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento transformante beta, factor de angiogénesis, antibióticos, agentes antifúngicos, agentes espermicidas, hormonas, enzimas, inhibidores de enzimas a la composición de colágeno de la invención como se describe en la presente memoria en la sección 4.4.2.7 para la liberación en la piel, y cualquier biomolécula descrita anteriormente. En ciertas realizaciones, los agentes farmacológicamente activos se proporcionan en una cantidad fisiológicamente eficaz.

En algunas realizaciones, la composición de colágeno está poblada adicionalmente por células vivas, incluyendo células madre alogénicas, excluyendo células madre embrionarias humanas, células madre, excluyendo células madre embrionarias humanas, y células adultas autólogas, antes de ser aplicadas al sitio de la herida.

25 La composición de colágeno de la invención es particularmente útil para el tratamiento de infecciones de heridas, *p. ej.*, infecciones de heridas, seguidas de rotura de heridas quirúrgicas o traumáticas. En una realización concreta, la composición de colágeno se impregna con una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente útil en el tratamiento de una infección de heridas, un antibiótico, un agente antimicrobiano, y un agente antibacteriano. La composición de colágeno de la invención tiene utilidad clínica y terapéutica en el tratamiento de infecciones de heridas de cualquier microorganismo conocido en la técnica, *p. ej.*, microorganismos que infectan heridas que se originan desde el interior del cuerpo humano, que es reservorio conocido para organismos patógenos, o de origen medioambiental. Los ejemplos de los microorganismos, cuyo crecimiento en las cuales en las heridas se puede reducir o prevenir mediante los métodos y composiciones de la invención son *S. aureus*, *St. epidermis*, *Estreptococos* betahemolíticos, *E. coli*, y especies *Klebsiella* y *Pseudomonas*, y entre las bacterias anaerobias, *Clostridium Welchii* o *tartium*, que son la causa de la gangrena gaseosa, principalmente en heridas traumáticas profundas.

35 En otras realizaciones, la composición de colágeno de la invención se utiliza para el tratamiento de heridas, incluyendo heridas epidérmicas, heridas de la piel, heridas crónicas, heridas agudas, heridas externas, heridas internas (*p. ej.*, La composición de colágeno se puede envolver alrededor de un sitio de anastomosis durante la cirugía para evitar el derrame de sangre desde las líneas de sutura, y para evitar que el cuerpo forme adherencias al material de sutura), heridas congénitas (*p. ej.*, epidermolisis bullosa distrófica). En particular, la composición de colágeno tiene una utilidad mejorada en el tratamiento de úlceras por presión (*p. ej.*, úlceras de decúbito). Las úlceras por presión se producen con frecuencia con pacientes sometidos a reposo prolongado en cama, *p. ej.*, tetrapléjicos y parapléjicos que sufren pérdida de piel debido a los efectos de la presión localizada. Las llagas por presión resultantes exhiben erosión cutánea y pérdida de la epidermis y apéndices de la piel. En otras realizaciones aún más específicas, la composición de colágeno de la invención se utiliza para el tratamiento de heridas, incluyendo, heridas de grosor parcial y completo, úlceras por presión, úlceras venosas, úlceras diabéticas, úlceras vasculares crónicas, heridas tunelizadas/socavadas, heridas quirúrgicas (*p. ej.*, sitios de donante/injerto, post-cirugía de Mohs, post-cirugía láser, podología, dehiscencia de la herida), herida por trauma (*p. ej.*, abrasiones, laceraciones, quemaduras de segundo grado, y desgarros de la piel) y las heridas de drenaje.

50 La composición de colágeno de la invención también se puede utilizarse en el tratamiento de quemaduras, incluyendo quemaduras de primer grado, quemaduras de segundo grado (quemaduras de espesor parcial), quemaduras de tercer grado (quemaduras de espesor completo), infección de heridas por quemadura, infección de heridas por quemadura escindidas y no escindidas, infección de heridas injertadas, infección del sitio del donante, pérdida del epitelio de una herida previamente injertada o quemadura curada o sitio de donante de injerto de piel e impétigo en herida por quemadura.

55 6.7.2.12 Dental

La composición de colágeno de la invención tiene utilidad particular en odontología, *p. ej.*, cirugía periodontal, regeneración guiada de tejidos para la regeneración del tejido periodontal, regeneración guiada ósea, y cobertura de raíz. La invención abarca el uso de la composición de colágeno de la invención para promover la regeneración de

defectos periodontales intraóseos, incluyendo defectos coincidentes bilaterales periodontales, defectos intraóseos interdentes, defectos intraóseos de 3 paredes profundos, defectos intraóseos de 2 paredes, y defectos intraóseos 2 y 3. Se espera que la composición de colágeno de la invención tenga una mayor utilidad terapéutica y unos mejores parámetros clínicos para el tratamiento de defectos intraóseos periodontales con respecto a otros mecanismos conocidos en la técnica, p. ej., el uso de membranas de colágeno entrecruzado tales como las descritas por Quteish et al., 1992, en *J. Clin. Periodontol.* 19(7): 476-84; Chung et al., 1990, *J. Periodontol.* 61(12): 732-6; Mattson et al., 1995, *J. Periodontol.* 66(7): 635-45; Benque et al., 1997, *J. Clin. Periodontol.* 24(8): 544-9; Mattson et al., 1999, *J. Periodontol.* 70(5): 510-7). Los ejemplos de los parámetros clínicos que mejoran utilizando la composición de colágeno de la invención incluyen las puntuaciones del índice placa y gingival, la profundidad del sondeo del bolsillo, la profundidad de sondeo de fijación, y la clasificación de participación de furcación y defecto óseo, que son conocidos por los expertos en la técnica.

La invención también incluye el uso de la composición de colágeno de la invención en el tratamiento de defectos de furcación de clase II incluyendo defectos bilaterales, defectos de furcación molar mandibular de Clase II bucal pareada, y defectos de furcación mandibular bilateral. La utilidad de la composición de colágeno de la invención en el tratamiento de los defectos de furcación de clase II se puede explicar en parte por su capacidad para regenerar el periodonto perdido en los defectos de furcación. Se espera que la composición de colágeno de la invención tenga una mayor utilidad terapéutica y clínica con respecto a las membranas de colágeno utilizadas en la técnica para el tratamiento de defectos de furcación de clase II, tales como los descritos por Paul et al., 1992, en *Int. J. Periodoncia Restaurativa Dent.* 12:123-31; Wang et al., 1994, *J. Periodontol.* 65:1029-36; Blumenthal, 1993, *J. Periodontol.* 64:925-33; Negro et al., 1994, *J. Periodontol.* 65:598-604; Yukna et al., 1995, *J. Periodontol.* 66:650-7).

La invención incluye adicionalmente el uso de la composición de colágeno de la invención en procedimientos de cobertura de la raíz. La utilidad de la composición de colágeno de la invención en la cobertura de la raíz se puede explicar en parte debido a su capacidad para reemplazar el tejido gingival perdido, dañado o enfermo basándose en los principios de regeneración tisular guiada. Se espera que la composición de colágeno de la invención tenga una mayor utilidad clínica en la cobertura de la raíz en comparación con las membranas de colágeno de la técnica utilizadas tradicionalmente para la cobertura de la raíz tales como las descritas por Shieh et al., 1997 en *J. Periodontol.* 68:770-8; Zahedi et al., 1998 *J. Periodontol.* 69:975-81; Ozcan et al., 1997 *J. Marmara Univ. Dent. Fa.* 2:588-98; Wang et al., 1997 *J. Dent. Res.* 78 (Spec Issue): 119 (Abstr. 106), por razones citadas más arriba.

La invención incluye además el uso de la composición de colágeno en un sujeto con una enfermedad periodontal, incluyendo periodontitis y gingivitis. La composición de colágeno de la invención también tiene utilidad clínica como un complemento a los procedimientos de escalamiento y planificación de la raíz. La invención incluye el tratamiento de un sujeto con una enfermedad periodontal utilizando una composición de colágeno de la invención. Un método ilustrativo para tratar una enfermedad periodontal en un sujeto con el uso de una composición de colágeno de la invención comprende la inserción de una composición de colágeno, que puede estar impregnada con un antibiótico tal como gluconato de clorhexidina, en uno o más bolsillos periodontales en el sujeto, p. ej., mayor o igual a 5 mm. Ventajosamente, la composición de colágeno puede ser biodegradable.

La composición de colágeno de la invención para su uso en odontología puede estar impregnada con una o más biomoléculas dependiendo del tipo de trastorno dental se esté tratando. Cualquier biomolécula conocida en la técnica para el tratamiento de trastornos dentales se engloba en las composiciones de la invención. En una realización específica, la composición de colágeno utilizada en el tratamiento de un trastorno dental asociado con una infección puede estar impregnada con uno o más antibióticos, incluyendo doxiciclina, tetraciclina, gluconato de clorhexidina, y minociclina.

6.7.2.13 Otros Usos

La composición de colágeno de la presente invención también se puede utilizar como barrera de adherencia postquirúrgica en los ovarios o trompas uterinas. La composición de colágeno también se puede usar como una barrera de adherencia en el cerebro (p. ej., en la prevención de la adherencia meningocerebral). Aquí, la composición de colágeno se puede utilizar para restaurar el espacio subdural que separa la paquimeninge y la leptomeninge. Generalmente, la composición de colágeno se puede utilizar como una envoltura sobre los órganos internos lesionados, por ejemplo, el bazo, o como una lámina adherida al pulmón para controlar las fugas post-operatorias. La composición de colágeno también se puede utilizar para apoyar el tratamiento quirúrgico de injertos de membrana timpánica (en perforaciones timpánicas), o como un revestimiento en las cavidades mastoideas. La composición de colágeno también se puede usar como un tejido de revestimiento en neovaginoplastia. En la cirugía cardiovascular, la composición de colágeno se puede utilizar como un material de cierre pericárdico. La composición de colágeno también se puede utilizar en la realización de anastomosis en vasovasostomía.

6.7.3. Usos de la composición que comprende células madre

En el contexto de cualquiera de los usos descritos anteriormente, ya sea cosmético o no cosmético, la composición puede comprender uno o más tipos de células madre, excepto las células madre embrionarias humanas, preferiblemente células madre placentarias, como se ha descrito más arriba en la Sección 5.6, anteriormente. Las células madre placentarias, cuando entran en contacto con una composición de la invención, secretan citoquinas

que promueven la curación de heridas, *p. ej.*, IL-6, IL-8 y MCP-1 (proteína quimiotáctica de monocitos-1). En realizaciones en las que la composición de la invención no comprende, o comprende cantidades insignificantes de fibronectina, las células madre placentarias secretan proteínas de la matriz extracelular, incluyendo fibronectina, cuando se permite que se anclen a la composición. De este modo, la composición, combinada con la células madre placentarias unidas a la composición, puede actuar creando una superficie o un conducto que estimule, y permita, la migración celular, *p. ej.*, en o a lo largo de una parte de un individuo que recibe la combinación.

La composición y las células madre, excepto las células madre embrionarias humanas, pueden administrarse a un individuo juntas. Por ejemplo, en una realización, la composición puede comprender dichas células que han sido puestas en contacto con la composición inmediatamente antes (*p. ej.*, en el plazo de 10-20 minutos) de la administración de la composición al individuo. En otra realización, las células madre, excepto las células de origen embrionario humano, se pueden poner en contacto con la composición en un momento antes de la administración suficiente para permitir que dichas células se unan a la composición, típicamente al menos 1 hora antes de la administración. En una realización más específica, el tiempo previo a la administración es un tiempo suficiente para que dichas células se unan y proliferen, típicamente al menos 24 horas a 48 horas, o más, antes de la administración. En otra realización más específica, el tiempo es un tiempo suficiente para que dichas células se unan a, y proliferen en, la composición de la invención, y depositen una cantidad detectable de una proteína de la matriz extracelular, *p. ej.*, fibronectina.

La composición y las células madre, excepto las células madre embrionarias humanas, se pueden administrar también al individuo por separado. Por ejemplo, en una realización, la composición se puede administrar a un individuo, *p. ej.*, en el sitio de una herida o un tejido que necesitan reparación, y dichas células se pueden administrar con posterioridad. En otra realización, dichas células se ponen en contacto con el sitio de una herida o tejido que necesitan reparación, y la herida o tejido que necesitan reparación se ponen en contacto con posterioridad con una composición de la invención.

En una realización, por lo tanto, la invención proporciona una composición para su uso en un método para promover la curación de una herida, que comprende poner en contacto la herida con una composición de la invención que comprende células madre, excepto células madre embrionarias humanas, *p. ej.*, células madre placentarias, en donde dichas células secretan IL-6, IL-8 o MCP-1, o cualquier combinación de las mismas, o secretan fibronectina, en al menos una porción de la herida. Cuando dichas células van a secretar fibronectina, se prefiere que la composición de colágeno de la invención comprenda una cantidad indetectable de fibronectina. En una realización específica, la composición se conforma o se forma aproximadamente a la conformación de la herida. En ciertas realizaciones, la herida es una herida que no cicatriza. En realizaciones específicas, la herida es una úlcera en la pierna, *p. ej.*, una úlcera venosa en la pierna, un úlcera arterial en la pierna, una úlcera diabética en la pierna o una úlcera de decúbito (por presión). Cuando la herida es una úlcera en la pierna, la composición se forma preferiblemente en una lámina lo suficientemente grande como para cubrir al menos una parte de la úlcera, y la lámina comprende células madre placentarias en al menos la cara de la lámina que se va a poner en contacto con la úlcera. En diversas realizaciones, la herida es una herida accidental, o es una herida causada por, o vinculada a, un procedimiento quirúrgico. El procedimiento quirúrgico puede ser cualquier procedimiento quirúrgico para el que resulta útil la composición de colágeno de la invención, como se ha comentado anteriormente, y puede ser cirugía conméctica o cirugía no cosmética.

En otra realización, la invención promueve la mejora o la curación de un defecto en una parte del cuerpo de un individuo. Tal defecto puede ser un defecto natural, *p. ej.*, genético, tal como una fístula, una válvula cardíaca defectuosa, una perforación de la pared abdominal.

6.8 Kits que comprenden las composiciones de colágeno

En otro aspecto, la presente invención proporciona kits que comprenden las composiciones de colágeno de la invención. Por ejemplo, la presente invención proporciona kits para su uso en el aumento o la sustitución de tejido de un mamífero. Los kits comprenden una o más composiciones de colágeno de la invención en un envase para su distribución a un profesional experto en la técnica. Los kits pueden comprender una etiqueta o etiquetado con instrucciones sobre el uso de la composición de colágeno para aumentar o sustituir el tejido de un mamífero de acuerdo con los métodos de la invención. En ciertas realizaciones, los kits pueden comprender componentes útiles para llevar a cabo los métodos tales como los medios para la administración de una composición de colágeno, tales como una o más jeringas, cánulas, catéteres, etc. En ciertas realizaciones, los kits pueden comprender componentes útiles para la eliminación segura de los medios para la administración de la composición de colágeno (*p. ej.*, un contenedor de objetos cortopunzantes para jeringas usadas). En ciertas realizaciones, los kits pueden comprender la composición en jeringas precargadas, en dosis individuales o paquetes de unidades de uso.

En otras ciertas realizaciones, los kits de la invención pueden comprender una composición de colágeno de la invención y uno o más componentes distintos para el cultivo de una población de células madre, excepto células madre embrionarias humanas. Por ejemplo, el kit puede comprender una composición de colágeno de la invención en una o más configuraciones adecuadas para el cultivo *p. ej.*, de células madre placentarias, *p. ej.*, una composición de colágeno en la forma de una lámina, tubo, malla, y similares. El kit puede comprender uno o más elementos para ser utilizados para el cultivo de dichas células, *p. ej.*, placas de cultivo que sean capaces de

contener la composición de colágeno de la invención durante el cultivo celular; material de plástico, jeringas, puntas de pipeta, medios de cultivo celular, una o más citoquinas o factores de crecimiento, desechables.

5 En otras realizaciones, el kit puede comprender uno o más componentes que facilitan la recogida de células madre del tejido placentario. En diversas realizaciones específicas, el kit comprende componentes que facilitan la perfusión de la placenta para recoger las células madre, *p. ej.*, solución de perfusión; una o más bandejas suficientemente grande para contener una placenta, material de vidrio o material de plástico para la recogida de la disolución de perfusión; una o más bolsas para la recogida de la disolución de perfusión, agujas y/o cánulas para canalizar los vasos umbilicales. En otras realizaciones específicas, el kit comprende uno o más componentes que facilitan la digestión enzimática del tejido placentario para aislar las células madre placentarias, *p. ej.*, una o más enzimas digestivas de tejido (*p. ej.*, tripsina, quimotripsina, o similares); material de plástico adecuado para el cultivo celular (*p. ej.*, fuentes de cultivo, placas de cultivo de múltiples pocillos, y similares).

10 En ciertas realizaciones, el kit comprende instrucciones para el uso de la composición de colágeno de la invención en al menos un contexto médico, *p. ej.*, cicatrización de heridas. En otras realizaciones, el kit comprende instrucciones para el cultivo de una o más poblaciones de células madre sobre una composición de colágeno de la invención.

7. Ejemplos

En las siguientes secciones, los expertos en la técnica reconocerán que la frase " a aproximadamente 23°C" puede referirse a la temperatura ambiente.

7.1 Ejemplo 1: Aislamiento de colágeno a partir de placentas

20 Este ejemplo ilustra el aislamiento de colágeno a partir de placentas.

Se obtienen placentas congeladas de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria. Las placentas se descongelan envolviéndolas en una bandeja Nalgene con agua durante 1-4 horas. A continuación se retiran de la envoltura de plástico y se colocan en agua para su posterior descongelación.

25 Las placentas descongeladas se colocan en la bandeja de acero inoxidable de una trituradora de carne. El fragmento de cordón umbilical se corta de cada placenta, y cada placenta se corta en aproximadamente 4 tiras a aproximadamente 23°C. Las tiras se Trituran con la trituradora de carne a aproximadamente 23°C.

Choque osmótico: Las placentas trituradas resultantes se añaden a un tanque Nalgene con NaCl 0,5 M (5 litros/placenta) y se mezclan utilizando un mezclador con motor a 75-100 rpm (24 horas a 4-6°C).

30 Después de 24 horas, el mezclador se detiene, se permite que el tejido se sedimente en el fondo de la mezcladora a aproximadamente 23°C. El tejido y el fluido se bombean fuera utilizando una bomba peristáltica con tubo del Núm. 36 TYGON® y se filtran a través de un tamiz del Núm. 40 a aproximadamente 23°C, y el tejido aislado se coloca de nuevo en el tanque de mezclado.

35 Se añade NaCl 0,5 M de nueva aportación (5 L/placenta) a la mezcla y se mezcla durante 24 horas a 4-6°C (mezclador con motor, 75-100 rpm). Después de 24 horas, el tejido se aísla utilizando el método descrito anteriormente.

El tejido se lava con agua (5 L/placenta) y se mezcla durante 24 horas a 4-6°C (mezclador con motor, 75-100 rpm). Después de 24 horas, el tejido se aísla utilizando el método descrito anteriormente.

El tejido se lava adicionalmente de nuevo con NaCl 0,5 M, de nuevo con NaCl 0,5 M y a continuación agua de acuerdo con los cuatro párrafos anteriores.

40 Secado por congelación: La muestra resultante se somete a un tratamiento de pre-congelación ("shelled") en cantidades de 200-400 g en un recipiente secador por congelación y se congela a -70°C durante 1-2 horas. La muestra congelada se seca por congelación durante 24-48 horas en un secador por congelación y a continuación se retira. La muestra secada por congelación se mezcla hasta un polvo uniforme en una batidora y a después se transfiere a un tanque de mezclado limpio.

45 Tratamiento con detergente: Se añade una disolución de ácido desoxicólico al 1% (1 L/placenta) al tanque de mezclado con la muestra secada por congelación batida. La muestra y la disolución de ácido desoxicólico al 1% se mezclan durante 24 horas a 4-6°C (mezclador con motor, 75-100 rpm). Al cabo de 24 horas, el mezclador se detiene, y el tejido se aísla con un tamiz del Núm. 40 como se ha descrito anteriormente.

50 El tratamiento con detergente se repite durante 24 horas a 4-6°C (mezclador con motor, 75-100 rpm). Después de 24 horas, el mezclador se detiene, y el tejido se aísla con un tamiz del Núm. 40 como se ha descrito anteriormente.

Lavado con agua: El tejido se lava con agua (5 L/placenta) y se mezcla durante 24 horas a 4-6°C (mezclador con motor, 75-100 rpm). Después de 24 horas, el tejido se aísla utilizando el método descrito anteriormente.

El tejido se lava de nuevo con agua (5 L/placenta) y se mezcla durante 24 horas a 4-6°C (mezclador con motor, 100-150 rpm). Después de 24 horas, el tejido se aísla utilizando el método descrito anteriormente.

El tejido se lava de nuevo con agua (5 L/placenta) y se mezcla durante 24 horas a 4-6°C (mezclador con motor, 150 rpm). Después de 24 horas, el tejido se aísla utilizando el método descrito anteriormente.

- 5 Opcionalmente, el tejido se lava con agua (5 L/placenta) una cuarta vez y se mezcla durante 24 horas a 4-6°C (mezclador con motor, 150 rpm). Después de 24 horas, el tejido se aísla utilizando el método descrito anteriormente.

Secado por congelación: La muestra resultante se añade a una batidora en cantidades de 200 g. Se añaden 200 mL de agua desionizada a la muestra, y la muestra se mezcla hasta obtener una pasta uniforme con la batidora. Las muestras batidas se combinan y se lavan con agua (1 L/placenta).

- 10 La muestra se añade en cantidades de 200-400 g a un recipiente secador por congelación. Las muestras se someten a un tratamiento de pre-congelación y se congelan a -70°C. Las muestras sometidas a un tratamiento de pre-congelación se secan por congelación durante 24-48 horas.

- 15 Tratamiento alcalino estéril: Las muestras secadas por congelación se reúnen. Se añade solución de hidróxido de sodio (0,5 M, 1 L) a un matraz esterilizado en autoclave. Se añade agua con bajo contenido de endotoxina (1 L) a las muestras secadas por congelación reunidas. Las muestras y la disolución de hidróxido de sodio se mezclan en un agitador a 250 rpm durante 4 horas a aproximadamente 23°C.

Lavado con agua estéril: La muestra se recupera mediante filtración a través de un filtro estéril del Núm. 70 y se enjuaga con 1 L de agua libre de endotoxinas. Se añade agua libre de endotoxinas (1 L), y la muestra se mezcla en un agitador a 250 rpm durante 18-24 horas a aproximadamente 23°C.

- 20 La muestra se recupera mediante filtración a través de un filtro estéril del Núm. 70. Se añade agua libre de endotoxinas (1 L), y la muestra se mezcla en un agitador a 250 rpm durante 18-24 horas a aproximadamente 23°C.

La muestra se recuperó mediante filtración a través de un filtro estéril del Núm. 70 y se enjuaga con 1 L de agua libre de endotoxinas. Se añade agua libre de endotoxinas (1 L), y la muestra se mezcla en un agitador a 250 rpm durante 18-24 horas a aproximadamente 23°C.

- 25 Si el pH es mayor de 9, la muestra se lava de nuevo con agua libre de endotoxinas y se mezcla en un agitador a aproximadamente 250 rpm durante aproximadamente 18-24 horas.

Si el pH es menor que o igual a 9, la muestra está lista para la formulación.

El rendimiento puede ser de 10 g/placenta o más.

- 30 La muestra resultante se puede secar por congelación para su almacenamiento. Para su uso, la muestra se puede suspender en disolución salina tamponada con fosfato a 300-1000 mg/mL en una batidora para su uso como una pasta, por ejemplo, en una jeringa. La muestra también se puede moldear en solución salina tamponada con fosfato a 500-1.000 mg/mL y conformar para su uso, por ejemplo, en forma de láminas, tubos, tapones.

7.2 Ejemplo 2: Preparación de muestras de colágeno telopeptídico

- 35 Se prepararon 7,5 g de colágeno telopeptídico de acuerdo con las etapas de choque osmótico, secado por congelación, tratamiento con detergente, lavado con agua, secado por congelación, tratamiento alcalino, lavado con agua y secado por congelación del Ejemplo 1.

Se prepararon 11,8 g de colágeno telopeptídico de acuerdo con las etapas choque osmótico, secado por congelación, tratamiento con detergente, lavado con agua, tratamiento alcalino, lavado con agua y secado por congelación del Ejemplo 1.

- 40 Se prepararon 12,0 g de colágeno telopeptídico de acuerdo con las etapas de choque osmótico, secado por congelación, tratamiento con detergente, lavado con agua, tratamiento alcalino, lavado con agua y secado por congelación del Ejemplo 1.

Se prepararon 11,8 g de colágeno telopeptídico de acuerdo con las etapas de choque osmótico, tratamiento con detergente, lavado con agua, tratamiento alcalino, lavado con agua y secado por congelación del Ejemplo 1.

- 45 7.3 Ejemplo 3: Análisis bioquímico

Se preparó una muestra de colágeno de acuerdo con los Ejemplos 1 y 2. El análisis bioquímico mediante técnicas convencionales mostró 80,40% en peso seco de colágeno, 11,00% de agua y menos de 0,01% de fibronectina, laminina y glicosaminoglicanos. No se determinó el contenido de elastina.

- 50 El análisis de aminoácidos de las muestras preparadas de acuerdo con los Ejemplos 1 y 2 mostró 34-35% de glicina, aproximadamente 11% de hidroxiprolina y 10-11% de prolina.

El inmunoanálisis de muestras preparadas de acuerdo con los Ejemplos 1 y 2 mostró 74-92% de colágeno tipo I, 4-6% de colágeno tipo III y 2-15% de colágeno tipo IV.

7.4 Ejemplo 4: Métodos alternativos para elaborar MEC, y cultivo de células madre placentarias sobre MEC

5 Este Ejemplo demuestra métodos alternativos de preparación de la composición de colágeno de la invención, y proporciona un análisis de la composición de los materiales elaborados mediante estos métodos.

Materiales y métodos

10 *Aislamiento de la matriz extracelular (MEC):* La MEC se aisló como sigue. En resumen, se descongeló una placenta humana congelada en cloruro de sodio 0,5 M, se trituró en una trituradora de carne y se lavó repetidamente en cloruro de sodio 0,5 M y agua en un agitador incubador a 23°C, seguido de un detergente tal como SDS al 1% o ácido desoxicólico al 0,5%. El tejido placentario libre de sangre se trató con hidróxido de sodio 0,1-0,5 N durante períodos que variaban entre 3 horas y 24 horas para solubilizar el tejido de los cotiledones, seguido de enjuagado con solución salina tamponada con fosfato (PBS) para neutralizar el pH. El material producido como tal era una pasta estable y se almacenó a 4°C.

15 *Análisis bioquímico.* Para determinar la composición bioquímica de la MEC aislada, se secó por congelación 1 gramo de muestra y se determinó el peso seco. La MEC se solubilizó disolviendo en HCl 100 mM a 70°C o mediante tratamiento con pepsina (1 mg/g) de la MEC en HCl 10 mM a 23°C durante 18 hrs. El tejido disuelto en HCl 100 mM se utilizó para determinar el contenido de fibronectina, laminina, GAG y elastina. El tejido solubilizado con pepsina se utilizó para determinar el contenido de colágeno.

20 Se determinaron las concentraciones de fibronectina y laminina utilizando un ELISA de tipo sándwich. El contenido de elastina y glicosaminoglicanos (GAG) se determinó utilizando un análisis basado en colorante. La Determinación del contenido de colágeno I se realizó mediante un ELISA sándwich (Chondrex). El contenido de colágeno III y IV se determinó utilizando ELISA diseñados por los autores de la presente invención utilizando anticuerpos primarios para colágeno tipo II y tipo IV y anticuerpos secundarios conjugados con HRP.

25 *Preparación de construcciones de MEC:* Para preparar láminas del material MEC, una capa de pasta de MEC hidratada se intercaló entre dos láminas TYVEK® de grado médico. Esta construcción se cargó en un secador de gel y se aplicó vacío durante la noche a 23°C hasta que la película de MEC estuvo seca. Las láminas se cortaron a un tamaño apropiado para los estudios de cultivo celular. Para preparar estructuras 3D de la MEC, la pasta de MEC se cargó en varios moldes y se secó por congelación para estudiar la estabilidad de las láminas de MEC y los moldes 3D en los medios o agua. Las construcciones se incubaron a 37°C hasta 1 semana, en agua, solución salina o medio de cultivo celular.

30 *Cultivo celular:* Las células madre placentarias se subcultivaron en DMEM al 60% de bajo contenido de glucosa (Invitrogen, Carlsbad, CA), MCDB-201 al 40% (Sigma, St. Louis, MO), suero bovino fetal al 2% (Hyclone, Logan, UT), 1x suplemento de insulina-transferrina-selenio (Invitrogen), ácido linoleico/albúmina de suero bovino al 0,02% (Sigma), 10 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico (Sigma), 10 ng/mL de factor de crecimiento derivado de plaquetas (R&D Systems, Minneapolis, MN), dexametasona 0,05 M (Sigma), ácido ascórbico 2-fosfato 0,1 mM (Sigma), y 100 U de penicilina/1000 U de estreptomina (Invitrogen). Las células madre placentarias (30.000 por pocillo) se sembraron sobre las películas de MEC que se habían colocado en placas de cultivo multipocillo de 24 pocillos. Las células madre placentarias también se sembraron a una densidad equivalente sobre portas con cámaras LabTek (Nalgene Nunc International, Rochester, NY) recubiertos previamente con colágeno (Inamed, Fremont, CA). Las células se incubaron a 37°C durante 3 y 48 horas y se procesaron para microscopía de inmunofluorescencia.

35 *Microscopía de inmunofluorescencia:* Después de 3 o 48 h de incubación con las películas de MEC, las construcciones de células madre placentarias-MEC se fijaron con formaldehído al 3,7% durante 10 minutos y se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,5% durante 20 minutos. Las células madre placentarias se incubaron con faloidina conjugada con AlexaFluor 488 para visualizar la F-actina. Para la tinción de fibronectina, las muestras incubadas con un anticuerpo anti-fibronectina de conejo humana (Sigma) en tampón de bloqueo (albúmina de suero bovino al 3%/1X solución salina tamponada con fosfato) durante 1 hora, se lavaron con solución salina tamponada con fosfato, y se incubaron adicionalmente con el anticuerpo anti-conejo conjugado con AlexaFluor 594 en tampón de bloqueo durante 30 minutos. Las muestras se lavaron de nuevo con solución salina tamponada con fosfato, se montaron sobre los portaobjetos y se observaron con un microscopio de fluorescencia.

40 *Análisis de la secreción de citoquinas:* Las muestras de medio (100 µl) se eliminaron de las láminas de MEC con cultivos celulares que contenían las células madre placentarias, así como de las placas tratadas con cultivo de tejidos que contenían células madre placentarias, a las 0, 3, 24 y 48 horas de cultivo. Las muestras se diluyeron en 1 mL de PBS y se analizaron para determinar la presencia de citoquinas. La concentración de cada citoquina se calculó a partir de un gráfico patrón de concentraciones conocidas de citoquinas.

55

Resultados

Aislamiento de MEC: El peso seco de una placenta típica es de aproximadamente 30 g, correspondiente a un peso húmedo de aproximadamente 300 g por placenta. Como se muestra en la FIG. 1, la etapa de choque osmótico y la etapa de lavado con detergente se pueden utilizar para eliminar una cantidad considerable de tejido que no es de matriz extracelular, con un peso residual final de aproximadamente 10 g. El uso de una combinación de solubilización utilizando NaOH y detergente da como resultado una mayor disminución del peso residual hasta aproximadamente 6 g. Se encontró que el tiempo de exposición a NaOH, y la concentración de NaOH, afectaban a la masa total de MEC aislada de la placenta. Se utilizaron variaciones de las etapas de lavado con detergente y NaOH de los autores de la presente invención para generar 5 variaciones del material de MEC final. Típicamente, una sola placenta produjo entre aproximadamente 6 g y aproximadamente 10 g de material de MEC.

Composición bioquímica de MEC: El análisis bioquímico de las 5 variaciones de las MEC mostró que estaban compuestas esencialmente de colágenos; siendo el Tipo I el principal colágeno (aproximadamente 74% a aproximadamente 90% de colágeno total), y siendo el Tipo III (aproximadamente 4% a aproximadamente 6% de colágeno total) y el tipo IV (aproximadamente 2% a aproximadamente 15% de colágeno total) los componentes minoritarios. La otra proteína principal de la matriz extracelular que se encuentra en la MEC de la placenta fue la elastina. Como se muestra en la Tabla 1, la elastina representó aproximadamente 3-5% del peso seco total de MEC-1 a MEC-4. Sin embargo, la MEC-5, que se había generado sin el uso de NaOH, contenía aproximadamente 12% de elastina. Si bien se identificaron glicosaminoglicanos en el material de MEC elaborado por los cinco métodos, el % de peso seco parecía no estar afectado por el uso de NaOH en los métodos de aislamiento. La presencia de proteínas de adherencia importantes fibronectina y laminina, por el contrario, fue espectacularmente sensible a la utilización de NaOH. La fibronectina y la laminina no sobrevivieron al tratamiento con NaOH, y no se pudieron encontrar en las MEC 1 al 4. Sin embargo, la MEC-5, que se había aislado sin el uso de NaOH, tenía una composición que era más rica en proteínas de adherencia (Tabla 1).

Tabla 1: Componentes de la matriz extracelular presentes en las composiciones de colágeno de la placenta elaboradas mediante diferentes métodos.

	Fibronectina	Laminina	GAG	Elastina
MEC-5	0,6%	0,16%	0,40%	12%
MEC-4	0	0	0,28%	4,7%
MEC-3	0	0	0,34%	3,2%
MEC-2	0	0	0,38%	4,4%
MEC-1	0	0	0,59%	3,5%

% = Porcentaje en peso seco

Estudios de unión celular: Tres horas después de la siembra, se observaron niveles similares de anclaje de las células madre placentarias en todas las MEC (Núms. 1-5). Los niveles de unión de las células madre a las MEC fueron ligeramente menores que los observados en el colágeno purificado. La inmunotinción para fibronectina en este momento reveló abundante tinción intracelular, sin fibronectina extracelular detectable. A las 48 horas de cultivo, se observó que las células madre placentarias aumentaban en número y adoptaban morfologías bien diseminadas similares en colágeno purificado, MEC2 y MEC4. En contraste, las células madre placentarias cultivadas sobre MEC1 no prosperaron. No solo se observaron menos células, sino que sus morfologías fueron redondeadas y no bien diseminadas. Las células madre placentarias sobre MEC5 aparecían más alargadas y polarizadas que las células madre placentarias sobre otras MEC o sobre colágeno.

La determinación del anclaje celular sobre MEC3 fue algo comprometido debido a la heterogeneidad de la superficie del material tras el secado. Debido a que era difícil tomar imágenes a lo largo de un plano de enfoque, parecía inicialmente que muy pocas células se habían anclado; sin embargo la observación en diferentes planos de enfoque reveló cierto grado de anclaje sobre MEC3.

La inmunotinción para fibronectina en el momento de las 48 h reveló una extensa red de fibrillas de la matriz de fibronectina extracelular sobre MEC1-MEC4. Estas fibrillas de la matriz de fibronectina estaban ensambladas por las células madre placentarias, ya que los controles en los que las células madre placentarias no se cultivaban sobre MEC no mostraron evidencia de fibrillas de fibronectina. En contraste con MEC1-MEC4, la MEC5 y el colágeno no apoyaron el ensamblaje de la matriz de fibronectina por las células madre placentarias; no se detectó fibronectina fibrilar extracelular sobre estas superficies.

Estudios de conjuntos de citoquinas: Los autores de la presente invención investigaron la secreción de citoquinas/quimiocinas clave a partir de células madre placentarias como consecuencia de la unión y la proliferación sobre la MEC. La secreción de citoquinas sobre MEC se comparó con la de las células madre placentarias incubadas sobre placas de cultivo celular tratadas para cultivo de tejidos. Se utilizó un conjunto de 25 citoquinas múltiplex patrón, que incluía varias interleuquinas y citoquinas (Biosource). Las citoquinas incluían IL-1 β , IL-1Ra, IL-2R, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p40/p70, IL-13, IL-15, IL-17, TNF- α , IFN- α , IFN- γ , GM-CSF, MIP-1 α , MIP-1 β , IP-10, MIG, eotaxina, RANTES y MCP-1. De las 25 citoquinas estudiadas, el aumento de la secreción de 3 citoquinas, IL-6, IL-8 y MCP-1 se observó cuando las células madre placentarias se cultivaron sobre láminas de MEC, además de la secreción por las células madre placentarias cultivadas sobre placas tratadas para el cultivo de tejidos. Las Figuras 2A-2C muestran un aumento dependiente del tiempo en la secreción de citoquinas (IL-6, IL-8 y MCP-1) por las células madre placentarias sobre las cinco construcciones de MEC. Todos los datos se normalizaron para 1.000 células unidas/cm². La MEC-5 fue anómala ya que no hubo un incremento evidente en la secreción de MCP-1, lo que sugiere un cambio en la fisiología celular de las células madre placentarias cuando se cultivaban sobre esta matriz extracelular. Como se ha mostrado anteriormente, MEC-5 no apoyó la expresión de fibronectina, muy diferente a MEC-1 a 4. Resulta interesante observar que MEC-5 fue la única matriz generada sin el uso de NaOH y tenía una composición bioquímica que mantenía las 2 proteínas de adherencia celular clave fibronectina y laminina.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende colágeno placentario telopeptídico tratado con detergente, tratada con álcali, y elastina, que está sustancialmente libre de fibronectina y laminina.
- 5 2. La composición de la reivindicación 1, en donde el colágeno es colágeno de mamífero, en particular, colágeno bovino, ovino, de rata o humano.
3. La composición de la reivindicación 2, en donde el colágeno placentario es colágeno placentario humano.
4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el colágeno está entrecruzado.
5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el colágeno está entrecruzado con glutaraldehído.
- 10 6. La composición de la reivindicación 1, que comprende de aproximadamente 3,2% a aproximadamente 4,7% de elastina.
7. Un kit para su uso en el aumento, voluminización o sustitución de tejido de un mamífero, que comprende la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y una etiqueta con instrucciones para administrar la composición.
- 15 8. Un procedimiento para preparar una composición que comprende colágeno placentario telopeptídico y elastina, que está sustancialmente libre de fibronectina y laminina de la placenta de un mamífero, comprendiendo dicho procedimiento, las etapas de:
 - a. poner en contacto el tejido con una disolución choque osmótico para producir una composición de colágeno y opcionalmente precedido o seguido de contacto del tejido con una disolución que tiene un potencial osmótico de una disolución de NaCl al menos 0,5 M;
 - 20 b. poner en contacto la composición de colágeno con un detergente; y
 - c. poner en contacto la disolución de colágeno tratada con detergente con una disolución alcalina; y que comprende opcionalmente adicionalmente la etapa de filtrar la disolución de colágeno tratada con detergente tratada con álcali, o que comprende adicionalmente la etapa de entrecruzar el colágeno para producir colágeno entrecruzado, en donde, opcionalmente, el colágeno está entrecruzado con glutaraldehído.
- 25 9. El procedimiento de la reivindicación 8, en donde la disolución de choque osmótico comprende agua con un potencial osmótico menor que el de NaCl 50 mM.
10. El procedimiento de la reivindicación 8 o 9, en donde la disolución alcalina comprende NaOH al menos 0,5 M.
- 30 11. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, que comprende adicionalmente la etapa de poner en contacto la composición de colágeno con un filtro de un tamaño que permite que una o más partículas virales pasen a través del filtro a la vez que retiene la composición de colágeno; en donde el filtro tiene aproximadamente 500 kDa, aproximadamente 750 kDa o aproximadamente 1.000 kDa.
12. El uso de la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la preparación de un medicamento para aumentar, voluminizar o sustituir tejido de un mamífero, en donde dicho medicamento se prepara para ser administrado al tejido del mamífero.
- 35 13. Uso de la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la preparación de un medicamento para promover la cicatrización de una herida en un sujeto, en donde medicamento se prepara para poner en contacto la herida con la composición y en donde, preferiblemente, el medicamento se prepara para ser administrado como relleno de la herida.
- 40 14. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso en un método para aumentar, voluminizar o sustituir tejido de mamífero, o para promover la cicatrización de una herida en un sujeto.
15. El uso de la reivindicación 13 o la composición para su uso de la reivindicación 14, en donde dicha herida es una úlcera, una úlcera venosa en la pierna, una úlcera arterial en la pierna, una úlcera diabética en la pierna o una úlcera de decúbito en la pierna.
- 45

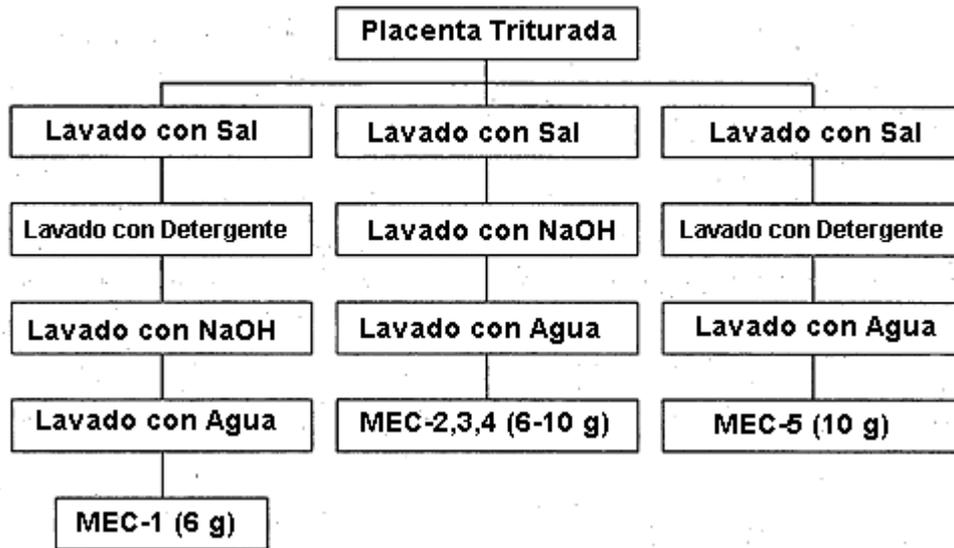


FIG. 1

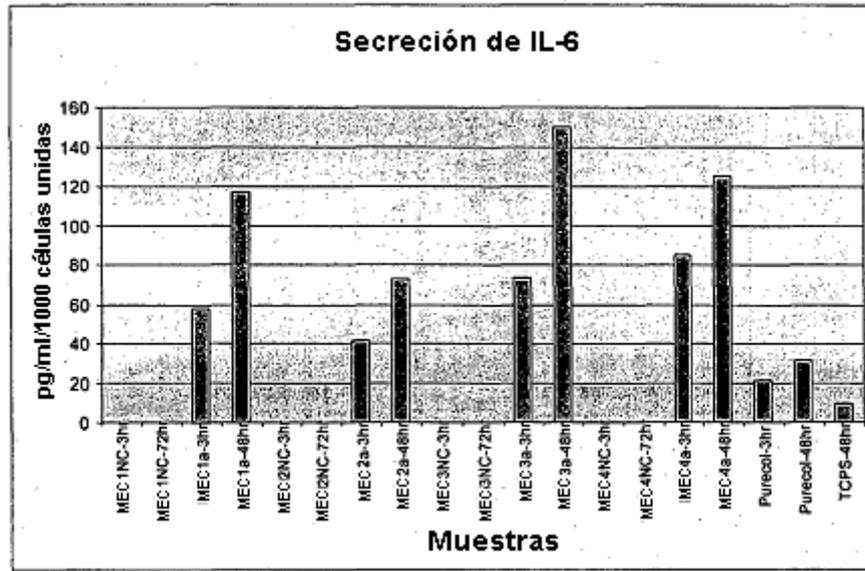


FIG. 2A

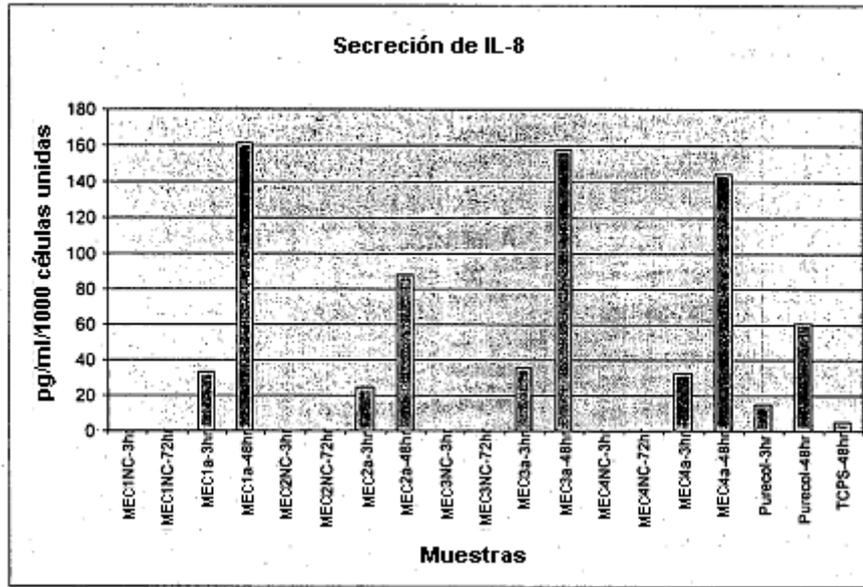


FIG. 2B

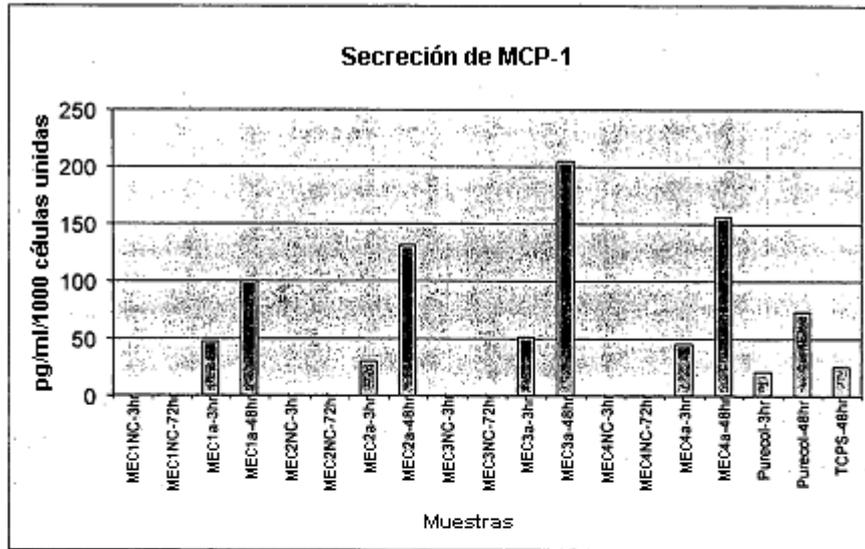


FIG. 2C