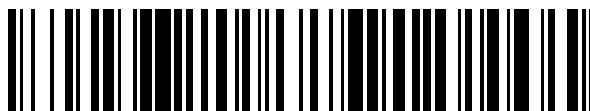


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 563 071**

51 Int. Cl.:

A61L 27/36 (2006.01)

A61L 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2008** **E 08772486 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.12.2015** **EP 2162142**

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

30 Prioridad:

10.07.2007 US 948793 P

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

10.03.2016

73 Titular/es:

**LIFECCELL CORPORATION (100.0%)
1 MILLENNIUM WAY
BRANCHBURG, NJ 08876, US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 563 071 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones acelulares de matriz tisular para reparación de tejidos.

5 Campo técnico

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

10 Antecedentes

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

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

US 2005/0013872 A1 da a conocer composiciones que comprenden matriz extracelular de médula ósea desprovista de células y usos de la misma. Se describen también métodos para reparación de tejidos u órganos defectuosos, enfermos, deteriorados o isquémicos en un individuo, preferiblemente un humano, utilizando la matriz extracelular de médula ósea desprovista de células. Se describe asimismo un dispositivo médico, preferiblemente un "stent" o un corazón artificial, y materiales biocompatibles, preferiblemente un andamiaje de regeneración de tejido, que comprende matriz extracelular de médula ósea desprovista de células para implantación en un individuo.

US 2006/0153815 A1 da a conocer dispositivos de diseño de tejidos para uso en la reparación o regeneración de tejido constituido por andamiajes de soporte y capas de células.

35 Sumario

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

Más específicamente, se proporciona un método de producción de una composición de malla biocompatible. El método incluye: a) incubar una pluralidad de fragmentos de una matriz de tejido acelular (ATM) en una solución ácida para crear una suspensión homogénea de fragmentos de ATM hinchados, en donde la solución ácida tiene un pH menor que 3,0 y no causa desnaturalización irreversible sustancial de fibras de colágeno en la ATM; b) aplicar la suspensión homogénea a un sustrato de malla biocompatible para crear un sustrato de malla recubierto; y c) secar el sustrato recubierto para formar una composición de malla. Los pasos (a) y (b) pueden realizarse simultáneamente.

La ATM puede ser o puede incluir dermis de la cual se han eliminado la totalidad o sustancialmente la totalidad de las células viables. La ATM puede incluir un tejido del cual se han eliminado la totalidad, o sustancialmente la totalidad, de las células viables, en donde el tejido se selecciona del grupo constituido por fascia, tejido pericárdico, duramadre, tejido de cordón umbilical, tejido placentario, tejido de válvula cardíaca, tejido de ligamento, tejido de tendón, tejido arterial, tejido venoso, tejido conectivo neural, tejido de vejiga urinaria, tejido de uréter, y tejido intestinal. La ATM puede estar hecha de tejido humano o tejido de mamífero no humano. El mamífero no humano puede ser un cerdo. En un aspecto, el mamífero no humano puede estar diseñado genéticamente de modo que carezca de la expresión de residuos α -1,3-galactosilo. El mamífero no humano puede carecer de un gen de α -1,3-galactosiltransferasa funcional. Los fragmentos de ATM pueden ser partículas de ATM.

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

ácido sulfúrico. La solución ácida puede incluir ácido acético 0,1 M. la solución ácida puede incluir ácido clorhídrico 0,04 M.

5 En un aspecto, el paso de incubación puede realizarse durante un periodo de aproximadamente 0,5 horas a aproximadamente 12 horas. El paso de incubación puede tener lugar durante un periodo de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 10,0 horas, desde aproximadamente 2,0 a aproximadamente 6 horas, o desde aproximadamente 2,5 a aproximadamente 5 horas. El paso de incubación puede tener lugar durante un periodo de aproximadamente 3 horas.

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

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

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

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

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

40 La ATM puede ser o incluir dermis de la cual se han eliminado todas o sustancialmente todas las células viables. La ATM puede incluir un tejido del cual se han eliminado todas, o sustancialmente la totalidad de las células viables, en donde el tejido se selecciona del grupo constituido por fascia, tejido pericárdico, duramadre, tejido del cordón umbilical, tejido placentario, tejido de válvula cardiaca, tejido de ligamento, tejido de tendón, tejido arterial, tejido venoso, tejido neural conectivo, tejido de vejiga urinaria, tejido de uréter, y tejido intestinal. La ATM puede estar
45 hecha de tejido humano o tejido de mamífero no humano. El mamífero no humano puede ser un cerdo. En algunas realizaciones, el mamífero no humano puede estar diseñado genéticamente de tal modo que carezca de residuos α -galactosilo. El mamífero no humano puede carecer de un gen funcional de α -1,3-galactosiltransferasa. Los fragmentos de ATM pueden ser partículas de ATM.

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

En un aspecto, el paso de incubación puede tener una duración de aproximadamente 0,5 horas hasta
60 aproximadamente 12 horas. El paso de incubación puede tener una duración de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 10,0 horas. El paso de incubación puede tener una duración de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 6 horas o de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 5 horas. El paso de incubación puede tener una duración de aproximadamente 3 horas.

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

aproximadamente 40°C, desde aproximadamente 35°C a aproximadamente 38°C, o desde aproximadamente 37°C a aproximadamente 42°C. La temperatura puede ser aproximadamente 37°C. La temperatura puede ser aproximadamente 25°C.

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

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

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

20 La ATM puede ser o incluir dermis de la cual la totalidad, o sustancialmente la totalidad de las células viables han sido eliminadas. La ATM puede incluir un tejido del cual la totalidad, o sustancialmente la totalidad de las células viables han sido eliminadas, en donde el tejido se selecciona del grupo constituido por fascia, tejido pericárdico, duramadre, tejido del cordón umbilical, tejido placentario, tejido de válvula cardíaca, tejido de ligamento, tejido de tendón, tejido arterial, tejido venoso, tejido conectivo neural, tejido de vejiga urinaria, tejido de uréter, y tejido intestinal. La ATM puede estar hecha de tejido humano o tejido de mamífero no humano. El mamífero no humano puede ser un cerdo. En algunas realizaciones, el mamífero no humano puede estar diseñado genéticamente de modo que carezca de la expresión de residuos α -1,3-galactosilo. El mamífero no humano puede carecer de un gen funcional de α -1,3-galactosiltransferasa. Los fragmentos de ATM pueden ser partículas de ATM.

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

35 En un aspecto, el paso de incubación puede tener una duración de aproximadamente 0,5 horas hasta aproximadamente 12 horas. El paso de incubación puede tener una duración de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 10,0 horas. El paso de incubación puede tener una duración de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 6 horas o de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 5 horas. El paso de incubación puede tener una duración de aproximadamente 3 horas.

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

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

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

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

En los métodos y composiciones arriba descritos, las realizaciones citadas pueden combinarse en cualquier combinación deseada.

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

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

Descripción detallada

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

I. Componentes de la Composición

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

Matrices de tejido acelulares

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

menos) de las células muertas y/o residuos celulares presentes en la ATM después de un proceso de eliminación de células.

A las ATM producidas a partir de dermis se hace referencia en esta memoria en algunos casos como "matrices dérmicas acelulares" ("ADM").

La ATM de la invención puede tener o carecer de una membrana basal epitelial. La membrana basal epitelial es una hoja delgada de matriz extracelular contigua con el aspecto basilar de las células epiteliales. Las hojas de células epiteliales agregadas forman un epitelio. Así, por ejemplo, el epitelio de la piel se conoce como la epidermis, y la membrana basal epitelial de la piel está comprendida entre la epidermis y la dermis. La membrana basal epitelial es una matriz extracelular especializada que proporciona una función de barrera y una superficie de fijación para las células de tipo epitelial; sin embargo, la misma no aporta papel estructural o biomecánico significativo alguno al tejido subyacente (v.g., la dermis). Componentes singulares de membranas basales epiteliales incluyen, por ejemplo, laminina, colágeno tipo VII y nidógeno. La organización singular temporal y espacial de la membrana basal epitelial distingue la misma de, v.g., la matriz dérmica extracelular. En algunas realizaciones, la presencia de la membrana basal epitelial en una ATM podría ser desventajosa en el sentido de que la membrana basal epitelial puede contener una diversidad de componentes específicos de especie que podrían suscitar la producción de anticuerpos, y/o fijarse a anticuerpos preformados, en receptores de injerto xenógenos de la matriz acelular. Adicionalmente, la membrana basal epitelial puede actuar como barrera para la difusión de células y/o factores solubles (v.g., quimioatrayentes) y la infiltración celular. Su presencia en una ATM puede retardar así significativamente la formación de tejido nuevo a partir de la ATM en un animal receptor. Como se utiliza en esta memoria, una ATM que "carece sustancialmente" de una membrana basal epitelial es una matriz de tejido acelular que contiene menos de 5% (v.g., menos de: 3%; 2%; 1%; 0,5%; 0,25%; 0,1%; 0,01%; 0,001%; o incluso menos de 0,001%) de la membrana basal epitelial poseída por el tejido no procesado correspondiente del cual se ha derivado la ATM.

Las ATM retienen los atributos biológicos y estructurales de los tejidos a partir de los cuales se producen las mismas, con inclusión del reconocimiento celular y fijación de células así como la capacidad para soportar la diseminación celular, la proliferación celular, y la diferenciación celular. Tales funciones son proporcionadas por proteínas de colágeno no desnaturalizadas (v.g., colágeno tipo I) y una diversidad de moléculas distintas de colágeno (v.g., proteínas que sirven como ligandos para moléculas tales como receptores de integrinas, moléculas con alta densidad de carga tales como glicosaminoglicanos (v.g., hialuronano) o proteoglicanos, u otras adhesinas). Funciones estructurales retenidas por ATM útiles incluyen mantenimiento de la arquitectura histológica, mantenimiento de la red tridimensional de los componentes de tejido y características físicas tales como resistencia, elasticidad, y durabilidad, porosidad definida, y retención de macromoléculas. La eficiencia de las funciones biológicas de una ATM puede medirse, por ejemplo, por la capacidad de la ATM para soportar la proliferación de células (v.g., células epiteliales) y es al menos 30% (v.g., al menos: 40%; 50%; 60%; 70%; 80%; 90%; 95%; 98%; 99%; 99,5%; 100%; o más de 100%) de la correspondiente al tejido u órgano nativo a partir del cual se produce la ATM. No es necesario que la ATM esté hecha de tejido que sea idéntico al tejido hospedador circundante, sino que debería simplemente ser susceptible de remodelación por células invasoras infiltrantes tales como células diferenciadas del tejido hospedador relevante, células del tallo mesenquimático, o células progenitoras. Debe entenderse que la ATM puede producirse a partir de cualquier tejido blando que contenga colágeno y esqueleto muscular (v.g., dermis, fascia, pericardio, duramadre, cordones umbilicales, placentas, válvulas cardíacas, ligamentos, tendones, tejido vascular (arterias y venas tales como venas safenas), tejido conectivo neural, tejido de vejiga urinaria, tejido de uréter, o tejido intestinal), con tal que las propiedades arriba descritas sean conservadas por la matriz.

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

De particular interés como donantes son animales no humanos (v.g., cerdos y vacas) que se han diseñado genéticamente para carecer del resto terminal galactosa- α -1,3-galactosa. Para descripciones de animales apropiados, véanse la Solicitud U.S. Publicada No. 2005/0028228 A1 y la Patente U.S. No. 6.166.288, también en tramitación. Un problema importante de xenotrasplante en animales receptores (v.g., humanos) que no expresan la enzima UDP-galactosa: β -D-galactosil-1,4-N-acetil-D-glucosaminida- α -1,3-galactosil-transferasa (α -1,3-galactosil-transferasa; " α -GT") que cataliza la formación de la estructura del disacárido terminal, galactosa α -1,3-galactosa (" α -gal"), es el rechazo hiperagudo de xenoinjertos en tales receptores. Este rechazo es en gran parte, si no exclusivamente, debido a la acción de anticuerpos específicos para el epítipo α -gal en la superficie de las células

del xenoinjerto. Se han obtenido animales transgénicos no humanos (v.g., cerdos y vacas) que carecen, o carecen sustancialmente, de α -GT funcional y por tanto carecen, o carecen sustancialmente también, de epítomos α -gal.

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

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

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

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

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

Para la producción de una composición de reparación de tejidos, se utilizan generalmente ATM en la forma de fragmentos (es decir, partículas, hebras o fibras) (véase más adelante). La ATM puede producirse por cualquiera de una diversidad de métodos. Todo lo que se requiere es que los pasos utilizados en su producción den como

resultado matrices con las propiedades biológicas y estructurales arriba descritas. Métodos particularmente útiles de producción incluyen los descritos en las Patentes U.S. Núms. 4.865.871; 5.366.616; 6.933.326 y las Solicitudes U.S. Publicadas Núms. 2003/0035843 A1, y 2005/0028228 A1, también en tramitación.

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

A continuación se resume un método ilustrativo de producción de ATM, que se describe con mayor detalle en la Patente U.S. No. 5.366.616.

Después de la retirada del donante, el tejido se dispone en una solución estabilizadora inicial. La solución estabilizadora inicial detiene y previene la degradación osmótica, hipóxica, autolítica, y proteolítica, protege contra la contaminación microbiana, y reduce el deterioro mecánico que puede ocurrir con tejidos que contienen, por ejemplo, componentes de musculatura lisa (v.g., vasos sanguíneos). La solución estabilizadora contiene generalmente un tampón apropiado, uno o más antioxidantes, uno o más agentes oncóticos, uno o más antibióticos, uno o más inhibidores de proteasas, en algunos casos, un relajante de la musculatura lisa.

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

Un tampón apropiado puede ser un tampón orgánico, por ejemplo ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), ácido 3-(N-morfolina)propanosulfónico (MPOS) y ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etano-sulfónico (HEPES). Alternativamente, un tampón bajo en sal o fisiológico, con inclusión de fosfato, bicarbonato y acetato-citrato, puede ser más apropiado en ciertas aplicaciones. Las sales pueden incluir sales fisiológicas comunes tales como cloruro de sodio o cloruro de potasio. Los antibióticos pueden incluir, por ejemplo, penicilina, estreptomycin, gentamicina, kanamicina, neomicina, bacitracina, y vancomicina. Adicionalmente, pueden emplearse agentes anti-fúngicos, que incluyen anfotericina-B, nistatina, y polimixina. Detergentes adecuados incluyen, sin limitación, por ejemplo, desoxicolato de sodio, Triton-X-100TM (Rohm & Haas, Filadelfia, PA); mono-oleato de polioxietilen-(20)-sorbitán (Tween 20); mono-oleato de polioxietilen-(80)-sorbitán (Tween 80); 3-[(3-cloramidopropil)-dimetilamino]-1-propano-sulfonato; octil-glucosido; y dodecil-sulfato de sodio. Agentes que inhiben o previenen la formación de reticulaciones pueden incluir ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), ácido ascórbico y otros agentes de barrido de radicales libres. Ejemplos de inhibidores de proteasas útiles incluyen, sin limitación, N-etilmaleimida.

(NEM), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), ácido etilenglicol-bis-(2-aminoetil-éter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA), leupeptina, cloruro de amonio, pH elevado y apoprotinina. Ejemplos de enzimas útiles incluyen, sin limitación, dispasa II, tripsina, y termolisina. En algunas realizaciones, puede incluirse en la solución de procesamiento un agente de equilibrio osmótico para proporcionar un equilibrio osmótico coloidal entre la solución y el tejido, previniendo así la difusión de proteoglicanos endógenos del tejido a la solución. El agente de equilibrio osmótico puede ser, por ejemplo, sin limitación, un proteoglicano, v.g., sulfato de condroitina, sulfato de heparina, o sulfato de dermatano, o un polímero, v.g., dextrano o polivinil-pirrolidona (PVP), o un aminoácido, v.g., glicina o valina.

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

Después de la eliminación de las células, el tejido puede congelarse (es decir, criopreservarse) y opcionalmente, liofilizarse. Antes de la congelación, el tejido puede incubarse en una solución de criopreservación. Esta solución contiene generalmente uno o más crioprotectores a fin de minimizar el deterioro por los cristales de hielo de la matriz estructural que podría ocurrir durante la congelación. Ejemplos de crioprotectores útiles se proporcionan en la Patente U.S. No. 5.336.616. Si el tejido debe liofilizarse, la solución contendrá también generalmente uno o más componentes de protección en seco, a fin de minimizar el deterioro estructural durante el secado, y puede incluir una combinación de un disolvente orgánico y agua que no sufre expansión ni contracción durante la congelación. Los agentes crioprotectores y protectores en seco, pueden ser las mismas una o más sustancias. Si el tejido no va a ser liofilizado, el mismo puede congelarse poniéndolo (en un recipiente esterilizado) en un congelador a aproximadamente -80°C, o por inmersión del mismo en nitrógeno líquido estéril, seguido por almacenamiento a una

temperatura inferior a -160°C hasta su utilización. La muestra puede descongelarse antes de ser utilizada mediante, por ejemplo, inmersión de una vasija estéril no permeable (véase más adelante) que contiene la muestra en un baño de agua a aproximadamente 37°C o dejando que el tejido vuelva a la temperatura ambiente en las condiciones ambientales.

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

La vasija que contiene el tejido se enfría a baja temperatura a un régimen especificado que es compatible con la formulación crioprotectora específica a fin de minimizar el deterioro por la congelación. Véase la Patente U.S. No. 5.336.615 para ejemplos de protocolos de enfriamiento apropiados. El tejido se seca luego a baja temperatura en condiciones de vacío, de tal modo que el vapor de agua se elimina secuencialmente de cada fase de cristales de hielo.

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

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

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

Un método apropiado para producir ATM particulada se describe en la Patente U.S. No. 6.933.326. El proceso se describe brevemente a continuación con respecto a una ATM dérmica liofilizada (matriz dérmica acelular; ADM), pero una persona con experiencia en la técnica podría adaptar fácilmente el método para uso con ATM congelada o liofilizada derivada de cualquiera de los otros tejidos enumerados en esta memoria.

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

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

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

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

Sustratos de malla

En algunas realizaciones, la composición biocompatible de reparación de tejidos puede incluir un sustrato de malla. Puede utilizarse cualquier sustrato de malla biocompatible, v.g., una malla quirúrgica. Sustratos de malla quirúrgica son materiales tejidos multifilamento que están disponibles en muchas formas y se han producido a partir de una diversidad de materiales sintéticos y naturales. Las mallas pueden clasificarse ampliamente conforme a la estructura del filamento, el tamaño de poro y el peso. La estructura de los filamentos puede ser de fibras monofilamento, multifilamento o multifilamento formadas a partir de materiales monofilamento. Los tamaños de poro de la malla pueden estar comprendidos entre aproximadamente 200 μ y aproximadamente 5.000 μ . Los tamaños de poro pequeños, v.g., 1000 μ o menores, son típicos de mallas de peso elevado, mientras que los tamaños de poro más pequeños, v.g., mayores que 1000 μ son característicos de mallas ligeras. El peso de malla se expresa como g/m², teniendo las mallas pesadas densidades de aproximadamente 80-100 g/m², en tanto que las mallas ligeras tienen densidades en el intervalo de 25-45 g/m².

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

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

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

Mallas compuestas, es decir, mallas que incluyen a la vez materiales absorbibles y no absorbibles pueden producirse a partir de combinaciones de los materiales arriba descritos o de materiales adicionales. Ejemplos de mallas compuestas disponibles comercialmente incluyen polipropileno/PTFE: Composix® (CR Bard, Inc., Cranston RI), Composix® E/X (CR Bard, Inc., Cranston RI), y Ventralex® (CR Bard, Inc., Cranston RI); polipropileno/celulosa: Proceed™ (Ethicon, Inc., Somerville, NJ); polipropileno/Seprafil®: Sepramesh® (Genzyme, Cambridge, MA), Sepramesh® IP (Genzyme, Cambridge, MA); polipropileno/Vicryl: Vypro™ (Ethicon, Somerville, N.J.), Vypro™ II

(Ethicon, Somerville, N.J.); polipropileno/Monocryl(poliglecaprona): Ultrapro® (Ethicon, Somerville, N.J.); y poliéster/colágeno: Parietex® Composite (Sofradim, Trévoux, Francia).

II. Preparación de la composición de reparación de tejidos

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

La ATM puede hincharse en cualquier solución ácida que mantenga los fragmentos de ATM como una suspensión homogénea, y no dé como resultado una desnaturalización sustancial irreversible de las fibras de colágeno en la ATM. Como se define en esta memoria, una suspensión homogénea de partículas de ATM es una en la cual las partículas de ATM están distribuidas uniformemente en un medio líquido y no contiene partículas que sean mayores que aproximadamente 1000 μ de tamaño, v.g., mayores que aproximadamente 950 μ , aproximadamente 975 μ , aproximadamente 1000 μ , aproximadamente 1025 μ , aproximadamente 1050 μ , aproximadamente 1075 μ , aproximadamente 1100 μ o mayores. Como se utiliza en esta memoria, "desnaturalización sustancial irreversible" se refiere en general a la disociación de las fibrillas de colágeno en sus sub-fibrillas y/o moléculas de colágeno constituyentes, tales que las sub-fibrillas y/o moléculas de colágeno sean sustancialmente incapaces de replegarse y reensamblarse en fibrillas de colágeno nativas. Como se utiliza en esta memoria, en las sub-fibrillas y/o moléculas de colágeno que son "sustancialmente incapaces de replegarse y reensamblarse en fibrillas de colágeno nativas", no más de 30% (v.g., no más de: 25%; 20%; 15%; 10%; 5%; 2%; 1%; 0,1%; 0,01%; o menos) de las sub-fibrillas y/o moléculas de colágeno son capaces de replegarse y reensamblarse en fibrillas de colágeno nativas. La fibrilla de colágeno nativa es un haz de muchas sub-fibrillas, cada una de las cuales es a su vez un haz de microfibrillas. Una microfibrilla consiste en moléculas de colágeno enrolladas helicoidalmente, cada una de las cuales consiste en tres cadenas de polipéptido helicoidales. Esta disposición de las moléculas de colágeno en las fibrillas de colágeno da como resultado una periodicidad de formación de bandas características de 64-67 nm. Típicamente, las fibrillas de colágeno desnaturalizadas irreversiblemente carecen, o carecen sustancialmente, de la periodicidad de formación de bandas encontrada en la fibrilla de colágeno nativa. La desnaturalización irreversible sustancial de las fibrillas de colágeno puede monitorizarse por cualquier método conocido por los expertos en la técnica incluyendo, por ejemplo, pero sin carácter limitante, microscopía electrónica de transmisión, microscopía electrónica de barrido, y microscopía de fuerza atómica, o por métodos bioquímicos o enzimáticos, v.g., electroforesis en gel de poliácridamida o susceptibilidad de escisión enzimática por colagenasa, pepsina o proteinasa K. Así, la ATM puede hincharse en cualquier solución ácida que no dé como resultado una pérdida sustancial de la periodicidad de formación de bandas.

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

Un ácido es una molécula de actúa como donante de protones y por tanto aumenta la concentración de H^+ de una solución. Los ácidos que ceden fácilmente protones al agua son ácidos fuertes, mientras que aquéllos que tienen solo una ligera tendencia a ceder protones son ácidos débiles. Un índice útil de la concentración de iones H^+ en una solución es la escala de pH; una solución acuosa con un pH menor que 7 se considera ácida. Así, los fragmentos de ATM pueden hincharse en cualquier solución acuosa que tenga un pH inferior a 7,0, v.g., 6,9, 6,5, 6,2, 6,0, 5,5, 5,0, 4,5, 4,0, 3,5, 3,0, 2,8, 2,6, 2,4, 2,2, 2,0, 1,8, 1,6, 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,0 e inferior. El pH será preferiblemente inferior a 3,0. "Aproximadamente" indica que el pH puede variar en hasta 0,2 unidades de pH por encima o por debajo del valor indicado. Así, un pH de "aproximadamente" 3,0, puede incluir, por ejemplo, pH 2,8, 2,85, 2,90, 2,95, 3,0, 3,05, 3,10, 3,15, o 3,20. Ejemplos de ácidos útiles incluyen ácido acético, ácido ascórbico, ácido bórico, ácido carbónico, ácido cítrico, ácido clorhídrico, ácido láctico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido tánico y ácido tricloroacético. Puede utilizarse también cualquier combinación de dos o más ácidos.

La concentración específica de ácido dependerá en parte de la fuerza relativa del ácido, requiriendo los ácidos más fuertes, v.g., ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, menores concentraciones, y requiriendo los ácidos más débiles, v.g., ácido acético, ácido cítrico, y ácido láctico concentraciones mayores. Así, la concentración y el límite más bajo de pH para la incubación variarán de un ácido a otro. En algunas realizaciones, el ácido es un ácido volátil, v.g., un ácido que se evapora fácilmente a las temperaturas y presiones normales. Concentraciones y valores de pH apropiados

son aquéllos que no dan como resultado una desnaturalización irreversible sustancial de las fibras de colágeno de la ATM (véase arriba).

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

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

La concentración final de ATM en la solución ácida puede ser cualquier concentración que se esponje uniformemente y que dé como resultado una suspensión homogénea de fragmentos de ATM. Las propiedades de hinchamiento pueden variar conforme a la procedencia del tejido del que se derivó la ATM; en general, concentraciones útiles (p/v) para ATM derivada de porcino pueden variar desde aproximadamente 0,1% v.g., 0,08%, 0,085%, 0,09%, 0,1%, 0,15% hasta aproximadamente 4%, v.g., aproximadamente 3,8%, 3,85%, 3,9%, 4,0%, 4,05%, 4,1%, 4,15%, o 4,2%. Una concentración adecuada para ATM derivada de porcino es 0,5%. La extensión de aumento en volumen de los fragmentos de ATM puede medirse por recogida de los fragmentos de ATM por centrifugación y determinación del volumen ocupado por los sedimentos antes y después del periodo de hinchamiento (véase Ejemplo 1). El cambio de volumen puede ser 1,2 veces, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces o más con relación a la ATM antes del hinchamiento con ácido. La extensión del hinchamiento variará de ATM a ATM y de especie a especie. Por regla general, pero no necesariamente, se utilizan condiciones de hinchamiento que dan como resultado un hinchamiento máximo de la ATM. Después del hinchamiento, los fragmentos de ATM ocuparán un volumen al menos 1,2 veces mayor que el ocupado antes del hinchamiento. Por ejemplo, los fragmentos pueden ocupar un volumen que es 1,2 veces, 1,5 veces, 1,8 veces, 2,0 veces, 3,0 veces, 4,0 veces, 5,0 veces, 6,0 veces, 7,0 veces, 8,0 veces, 9,0 veces, 10,0 veces, 11,0 veces, 12,0 o más veces mayor que el volumen ocupado antes del hinchamiento. Puede utilizarse cualquier método conocido en la técnica para ensayar la extensión del hinchamiento, con inclusión, por ejemplo, sin limitación, de la medida directa del volumen ocupado por la ATM, o medidas indirectas tales como cambios en densidad, viscosidad o dispersión de la luz de la solución de ATM.

La suspensión homogénea de los fragmentos de ATM puede someterse a temperaturas moderadamente elevadas con relación a la temperatura ambiente. Como se define en esta memoria, la temperatura ambiente es de aproximadamente 23°C hasta aproximadamente 27°C, v.g., 23°C, 24°C, 25°C, 26°C o 27°C. Como se define en esta memoria, "temperaturas moderadamente elevadas" incluyen temperaturas que van desde aproximadamente 28°C hasta aproximadamente 44 °C, v.g., 28 °C, 29 °C, 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C, 37 °C, 38 °C, 39 °C, 40 °C, 41 °C, 42 °C, 43 °C o 44 °C. La ATM puede someterse a temperaturas moderadamente elevadas antes del paso de hinchamiento en ácido, simultáneamente al paso de hinchamiento en ácido, o después del paso de hinchamiento en ácido. "Aproximadamente" indica que la temperatura puede variar en hasta 2°C por encima o por debajo del valor citado. Así, una temperatura de "aproximadamente" 30°C puede incluir, por ejemplo, 28,0 °C, 28,5 °C, 29,0 °C, 2,95 °C, 30,0 °C, 30,5 °C, 31,0 °C, 31,5 °C, o 32,0 °C. La suspensión homogénea de los fragmentos de ATM puede someterse a una temperatura moderadamente elevada durante, por ejemplo, aproximadamente 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, 10,0, 11,0, 12,0, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 o más horas. "Aproximadamente" indica que el tiempo hinchamiento puede variar en hasta 0,2 horas por encima o por debajo del valor citado. Así, un tiempo de hinchamiento de "aproximadamente" 3 horas puede incluir, por ejemplo, 2,8 horas, 2,85 horas, 2,90 horas, 2,95 horas, 3,0 horas, 3,05 horas, 3,10 horas, 3,15 horas, o 3,20 horas.

Una vez que la ATM se ha hinchado en ácido y se ha sometido a temperaturas elevadas, la misma puede utilizarse en forma de una composición de malla biocompatible o una composición de film dérmico biocompatible. Para formar la composición de malla biocompatible, la solución homogénea de ATM puede aplicarse a una malla biocompatible de tal modo que la malla tejida se impregne con la solución. Pueden utilizarse cualesquiera métodos para recubrimiento de materiales de malla que retengan las propiedades biocompatibles de la malla recubierta. Por ejemplo, la ATM hinchada puede verterse o extrudirse en un recipiente y los materiales de malla añadirse a y/o embeberse en la suspensión de ATM. Alternativa o adicionalmente, la ATM hinchada puede depositarse sobre la malla por aerosolización, pulverización, centrifugación o filtración. Puede utilizarse cualquier recipiente conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo, una cápsula plana de polipropileno o poliestireno. De modo alternativo, o adicionalmente, los materiales de malla pueden disponerse en un molde de tamaño apropiado y recubrirse por

vertido o extrusión de la ATM hinchada sobre la malla. La malla recubierta puede secarse luego y, opcionalmente, el proceso de recubrimiento y secado puede repetirse una, dos, tres, o más veces.

En general, la malla puede sumergirse en la solución de ATM hasta una profundidad de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,0 cm que depende, en parte, de la magnitud de hinchamiento de las protuberancias de la ATM y el espesor de recubrimiento deseado. Más específicamente, la malla puede recubrirse con aproximadamente 5 mg a aproximadamente 10 mg de peso seco de ATM por cm^2 de malla. Así, la malla puede recubrirse con 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, o 10,0 mg de ATM por cm^2 de malla. Dependiendo de cuántas veces se repita el proceso de recubrimiento, el recubrimiento de ATM sobre la malla puede ser desde aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1,0 mm de espesor. El espesor del recubrimiento puede variar dependiendo de la aplicación propuesta. Así, recubrimientos más finos pueden ser más adecuados para mallas que deban enrollarse e insertarse, por ejemplo, por medio de un trocar, mientras que pueden utilizarse recubrimientos más gruesos para mallas que deban aplicarse directamente a un tejido en necesidad de reparación. Films dérmicos biocompatibles pueden formarse por secado de la solución homogénea de ATM en una vasija apropiada para dar una hoja semejante a un film o de tipo esponja que pueda retirarse de la vasija (véase el Ejemplo 2). Puede utilizarse cualquier vasija conocida por los expertos en la técnica, por ejemplo, una cápsula plana de polipropileno o poliestireno. Alternativamente, puede utilizarse una cápsula contorneada para proporcionar textura o funcionalidad, por ejemplo, nervadura, estriación, o corrugación, a la superficie del recubrimiento de ATM. La solución de ATM puede aplicarse a una superficie hasta una profundidad de aproximadamente 0,5 a 1,0 mm. De modo más específico, pueden utilizarse aproximadamente 5 mg a aproximadamente 10 mg de ATM por cm^2 de área de superficie de la vasija. Así, la vasija puede estar recubierta con 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, o 10,0 mg de ATM por cm^2 .

La composición biocompatible de reparación de tejidos puede secarse por cualquier método conocido en la técnica que dé como resultado la retención de las funciones biológicas y físicas de la composición de reparación de tejidos. Métodos de secado incluyen, sin limitación, v.g., secado al aire, secado en atmósfera de, o bajo una corriente de, gas inerte (v.g., nitrógeno o argón). La temperatura de secado puede ser la temperatura ambiente, v.g., aproximadamente 25°C, o puede ser una temperatura que es moderadamente elevada con relación a la temperatura ambiente, v.g. 28°C, 29°C, 30°C, 31°C, 32°C, 33°C, 34°C, 35°C, 36°C, 37°C, 38°C, 39°C, 40°C, 41°C, 42°C, 43°C o 44°C. Alternativamente, la composición biocompatible de reparación de tejidos puede liofilizarse. La liofilización es un método rutinario utilizado en la técnica (véanse, por ejemplo, las patentes U.S. Núms. 4,619,257; 4,676,070; 4,799,361; 4,865,871; 4,964,280; 5,024,838; 5,044,165; 5,154,007; 6,194,136; 5,336,616; 5,364,756; y 5,780,295), estando disponible equipo adecuado de fuentes comerciales tales como Labconco (Kansas City, MI, EE.UU.). La liofilización implica la eliminación de agua u otro disolvente de un producto congelado por un proceso denominado sublimación. La sublimación ocurre cuando un líquido congelado (sólido) pasa directamente al estado gaseoso sin pasar por la fase líquida. Los expertos en la técnica son perfectamente conocedores de las diferentes metodologías de liofilización disponibles en la técnica [véase, v.g., "A Guide to Freeze-drying for the Laboratory" - una aplicación de servicio para la industria por Labconco, (2004); y Franks (1994) Proc. Inst. Refrigeration, 91: 32-39]. La liofilización puede realizarse por cualquiera de una diversidad de métodos, que incluyen, por ejemplo, los métodos de colector, lotes, o a granel.

En algunas realizaciones, las moléculas de la ATM (v.g., moléculas de colágeno), con o sin sustratos de malla, pueden reticularse químicamente (v.g., enlazarse covalentemente) consigo mismas y/o, en el caso de sustratos de malla recubiertos de ATM, con el sustrato de malla. Los agentes químicos de reticulación pueden ser homobifuncionales (tiene lugar la misma reacción química en cada extremo del enlazador) o hetero-bifuncionales (tienen lugar reacciones químicas diferentes en los extremos del enlazador). Las químicas disponibles para tales reacciones de enlace incluyen, pero sin carácter limitante, reactividad con grupos sulfhidrilo, amino, carboxilo, diol, aldehído, cetona, u otros grupos reactivos utilizando químicas electrófilas o nucleófilas, así como reticuladores fotoquímicos que utilizan radicales alquil- o aromático-azido o carbonilo. Ejemplos de agentes químicos de reticulación incluyen, sin limitación, aldehído glutárico, carbodiimidas, bisdiazobencidina, y N-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimido-éster. Reticuladores químicos están disponibles ampliamente de fuentes comerciales (v.g., Pierce Biotechnology (Rockford, IL); Invitrogen (Carlsbad, CA); Sigma-Aldrich (St.Louis, MO); y US Biological (Swampscott, MA)). Reactivos de reticulación particularmente adecuados incluyen hidrocloreto de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDAC) y N-hidroxisulfosuccinimida (NHS).

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

Opcionalmente, las composiciones biocompatibles de reparación de tejidos pueden someterse a tratamientos a fin de disminuir la biocarga. Se espera que este proceso reduzca el nivel de microorganismos infecciosos en las composiciones biocompatibles de reparación de tejidos. Como se utiliza en esta memoria, un proceso utilizado para desactivar o destruir "sustancialmente todos" los microorganismos (v.g., bacterias, hongos (con inclusión de levaduras), y/o virus) en las composiciones biocompatibles de reparación de tejidos es un proceso que reduce el

nivel de microorganismos en las composiciones biocompatibles de reparación de tejidos al menos 10 veces (v.g., al menos 100 veces; 1000 veces; 10^4 veces; 10^5 veces; 10^6 veces; 10^7 veces; 10^8 veces; 10^9 veces; o incluso 10^{10} veces) comparado con el nivel en las composiciones biocompatibles de reparación de tejidos antes del proceso. Puede utilizarse cualquier método estándar de ensayo para determinar si el proceso ha sido satisfactorio. Estos ensayos pueden incluir técnicas que miden directamente el crecimiento microbiano, v.g. el cultivo de muestras de frotis en medios de cultivo artificiales, o métodos de detección molecular, tales como PCR cuantitativa.

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

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

Generalmente, la composición biocompatible de reparación de tejidos se rehidrata antes del injerto o implantación. Alternativamente, la composición biocompatible de reparación de tejidos puede insertarse o implantarse sin rehidratación previa; en este caso, la rehidratación ocurre *in vivo*. Para la rehidratación, la composición biocompatible de reparación de tejidos puede incubarse en cualquier solución biológicamente compatible, por ejemplo, solución salina normal, solución salina tamponada con fosfato, lactato de Ringer o medio de cultivo de células estándar. La composición biocompatible de reparación de tejidos se incuba en una solución durante un tiempo suficiente para que la composición biocompatible de reparación de tejidos llegue a hidratarse por completo o recupere sustancialmente la misma cantidad de agua que contiene la mixtura a partir de la cual se preparó la composición biocompatible de reparación de tejidos. Generalmente, el tiempo de incubación en la solución de rehidratación será desde aproximadamente 15 segundos a aproximadamente 1 hora, v.g., aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 45 minutos, o aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 30 minutos. "Aproximadamente" indica que el tiempo de incubación puede variar en hasta 20% por encima o por debajo del valor citado. Así, un tiempo de incubación de "aproximadamente " 30 minutos puede incluir, por ejemplo, 24 minutos, 25 minutos, 26 minutos, 27 minutos, 28 minutos, 29 minutos, 30 minutos, 31 minutos, 32 minutos, 33 minutos, 34 minutos, 35 minutos, o 36 minutos. La solución de rehidratación puede reemplazarse opcionalmente con solución fresca tantas veces como se desee. La temperatura de las incubaciones será generalmente la temperatura ambiente (v.g., la de la sala) o puede ser desde aproximadamente 15°C a aproximadamente 40°C, v.g., aproximadamente 20°C a aproximadamente 35°C. "Aproximadamente" indica que la temperatura puede variar en hasta 2°C por encima o por debajo del valor citado. Así, una temperatura de "aproximadamente " 30°C puede incluir, por ejemplo, 28,0 °C, 28,5 °C, 29,0 °C, 2,95 °C, 30,0 °C, 30,5 °C, 31,0 °C, 31,5 °C, o 32,0 °C. La vasija que contiene la composición biocompatible de reparación de tejidos y la solución de rehidratación puede agitarse suavemente durante la incubación, en caso deseado. Después de la rehidratación, la composición biocompatible de reparación de tejidos puede conformarse o recortarse ulteriormente en una forma adecuada para implantación en un sitio particular.

III. Reparación de tejidos y órganos

Las composiciones biocompatibles de reparación de tejidos descritas en esta memoria pueden utilizarse para tratar cualquiera de una amplia gama de trastornos en los cuales es necesaria mejora o reparación de tejidos. Los defectos tisulares pueden surgir de diversas condiciones médicas, que incluyen, por ejemplo, malformaciones congénitas, lesiones traumáticas, infecciones, y resecciones oncológicas. Así, las composiciones biocompatibles de reparación de tejidos pueden utilizarse para reparar defectos en cualquier tejido blando, v.g. tejidos que conectan, soportan, o rodean otras estructuras y órganos del cuerpo. Las composiciones biocompatibles de reparación de tejidos pueden utilizarse también en respaldo de la reparación ósea (v.g., como un injerto de periostio para soportar

hueso o un injerto articular a fin de impulsar la reparación de cartílago. El tejido blando puede ser cualquier tejido no óseo. El tejido blando puede ser también tejido epitelial, que cubre el exterior del cuerpo y reviste los órganos y cavidades en el interior del cuerpo. Ejemplos de tejido epitelial incluyen, pero sin carácter limitante, epitelios escamosos simples, epitelios escamosos estratificados, epitelios cuboidales, o epitelios columnares.

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

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

Las composiciones biocompatibles de reparación de tejidos son muy adecuadas para la reparación de hernias. Una hernia es la protrusión de los contenidos de una cavidad del cuerpo fuera de la cavidad del cuerpo en la que se encuentran normalmente sus contenidos. Estos contenidos están encerrados a menudo en la membrana delgada que reviste el interior de la cavidad del cuerpo; a la membrana y su contenido juntos se hace referencia como un "saco hernial". Muy comúnmente, las hernias se desarrollan en el abdomen, cuando un adelgazamiento en la pared abdominal se expande en un orificio o defecto localizado a través del cual ocurre la protrusión intestinal. Estas debilidades de la pared abdominal ocurren típicamente en localizaciones de adelgazamiento natural de la pared abdominal, es decir, en sitios en los que existen aberturas naturales que permiten el paso de canales para los vasos sanguíneos que se extienden desde el abdomen a las extremidades y otros órganos. Otras áreas de posible debilidad son sitios de cualquier cirugía abdominal previa. El tejido graso entra usualmente en primer lugar en una hernia, pero puede ir seguido de un segmento de intestino u otro órgano intraabdominal. Si un segmento de órgano interno llega a quedar atrapado en el interior del saco hernial de tal modo que el suministro de sangre al órgano se dificulta, el paciente se encuentra en riesgo de complicaciones graves que incluyen bloqueo intestinal, gangrena, y muerte. Las hernias no se curan espontáneamente y a menudo aumentan de tamaño a lo largo del tiempo, por lo que es necesaria la reparación quirúrgica para corregir la afección. En general, las hernias se reparan por re inserción del saco hernial de nuevo en la cavidad del cuerpo seguido por reparación del tejido muscular debilitado.

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

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

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

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

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

Las composiciones biocompatibles de reparación de tejidos pueden aplicarse a un individuo que precisa tratamiento utilizando métodos conocidos por los expertos en la técnica. Las composiciones biocompatibles de reparación de tejidos pueden: (a) envolverse alrededor de un tejido que está deteriorado o que contiene un defecto; (b) colocarse sobre la superficie de un tejido que está deteriorado o tiene un defecto; (c) enrollarse e insertarse en una cavidad, abertura, o espacio en el tejido. Una o más (v.g., una, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, o más) de tales reparaciones de tejido biocompatibles, apiladas o adyacentes una a otra, pueden utilizarse en cualquier sitio particular. Las composiciones biocompatibles de reparación de tejidos pueden mantenerse en su lugar mediante, por ejemplo, suturas, grapas, ligaduras, o colas o selladores de tejido conocidos en la técnica. Alternativamente, si, por ejemplo, se compactan con estanqueidad suficiente en un defecto o cavidad, las mismas pueden no precisar dispositivo de fijación alguno.

Agentes terapéuticos

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

Naturalmente, la administración de los agentes arriba mencionados puede ser simple, o múltiple, (v.g., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 80, 90, 100, o tantas como sean necesarias). En el caso de ser múltiple, las administraciones pueden realizarse a intervalos de tiempo fácilmente determinables por una persona experta en la técnica. Las dosis de las diversas sustancias y factores pueden variar notablemente conforme a la especie, edad, peso, volumen, y sexo del individuo, y son también fácilmente determinables por un profesional experto.

Células viables histocompatibles pueden restablecerse en las composiciones biocompatibles de reparación de tejidos para producir un injerto aceptado de modo permanente que puede ser remodelado por el hospedador. Las células pueden derivarse del receptor propuesto o de un donante alogénico. Tipos de células con las cuales pueden repoblarse las composiciones biocompatibles de reparación de tejidos incluyen, pero sin carácter limitante, células no humanas del tallo embrionario (ESC), células adultas o embrionarias del tallo mesenquimático (MSC), monocitos, células del tallo hematopoyético, células epiteliales gingivales, células endoteliales, fibroblastos, o células del tallo de ligamentos periodontales, procondroblastos, condroblastos, condrocitos, pro-osteoblastos, osteocitos u osteoclastos. Puede utilizarse cualquier combinación de dos o más de estos tipos de células (v.g., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10) para repoblar la composición biocompatible de reparación de tejidos. Métodos para aislamiento de tipos específicos de células son bien conocidos en la técnica. Las células del donante pueden utilizarse inmediatamente después de su recogida o pueden cultivarse *in vitro* utilizando técnicas estándar de cultivo de tejido. Las células del donante pueden infundirse o inyectarse en la composición biocompatible de reparación de tejidos *in situ* inmediatamente antes de la colocación de la composición biocompatible de reparación de tejidos en un individuo mamífero. Las células del donante pueden cocultivarse también con la composición de reparación de tejidos biocompatible utilizando métodos estándar de cultivo de tejido conocidos por los expertos en la técnica.

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

Factores que son proteínas pueden suministrarse también a un individuo receptor por administración al individuo de: (a) vectores de expresión (v.g., plásmidos o vectores virales) que contienen secuencias de ácido nucleico que codifican uno cualquiera o más de los factores arriba indicados que son proteínas; o (b) células que han sido transfectadas o transducidas (de manera estable o transitoria) con tales vectores de expresión. Tales células transfectadas o transducidas se derivarán preferiblemente de, o serán histocompatibles con el receptor. Sin embargo, es posible que se requiera sólo breve exposición al factor y por tanto, es posible que puedan utilizarse también células histoincompatibles.

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

También pueden incluirse agentes quimioterapéuticos en las composiciones biocompatibles de reparación de tejidos. Los tumores malignos que aparecen en tejidos blandos, incluyendo por ejemplo los tumores de esófago, estómago, colon y vejiga se tratan típicamente por resección del tumor y administración sistémica de fármacos anticáncer. La incorporación de agentes anticáncer en las composiciones de reparación tejidos biocompatibles puede proporcionar altas concentraciones locales de quimioterapia, mitigando con ello la toxicidad asociada con dosis sistémicas elevadas a largo plazo. Ejemplos de clases de agentes quimioterapéuticos incluyen, sin limitación, 1) agentes alquilantes, v.g., ciclofosfamida; 2) antraciclinas, v.g., daunorubicina, doxorubicina; 3) disruptores cicloesqueléticos, v.g., paclitaxel; 4) inhibidores de topoisomerasas, v.g., etoposido; 5) análogos de nucleótidos, v.g., azacitidina, fluorouracilo, gemcitabina; 6) péptidos, v.g., bleomicina; 7) agentes basados en platino, v.g.,

carboplatino, cisplatino; 8) retinoides, v.g., ácido todo-trans-retinoico; y 9) alcaloides de la vinca, v.g., vinblastina o vincristina.

IV. Artículos de Fabricación

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

Se han descrito cierto número de realizaciones de la invención. No obstante, se comprenderá que pueden hacerse diversas modificaciones sin apartarse del alcance de la invención. De acuerdo con ello, otras realizaciones están dentro del alcance de las reivindicaciones que siguen.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Métodos y Materiales

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

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

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

Tabla 1: Hinchamiento de la ATM en ácido acético

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

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

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

Los pasos iniciales en la preparación de la malla recubierta de film y recubierta con esponja eran idénticos. Resumidamente, la ATM se hinchó en ácido y se vertió sobre malla de polipropileno. El secado de la malla recubierta en una atmósfera de nitrógeno/aire produjo una malla recubierta uniformemente, de aproximadamente 0,5 mm de espesor, que se asemejaba a celofán; a este material se hace referencia como "malla recubierta de filma". En contraste, la liofilización de la malla recubierta dio como resultado un material con consistencia floja, de aproximadamente 2-3 mm de espesor, que se asemejaba a un ovillo de algodón; a este material se hace referencia como "malla recubierta de esponja".

Preparación de la malla de polipropileno recubierta de film. Se lavó ATM (2,5 mg ATM/cm² de malla de polipropileno) 3 veces en agua para eliminar el crioprotector y las sales residuales, y se hinchó luego en ácido acético 100 milimolar a una concentración final de 0,5% ATM durante 3 horas a la temperatura ambiente. La malla de polipropileno (malla PROLENE, Ethicon, Inc.) se cortó en trozos de aproximadamente 7,5 cm por 2,5 cm, y cada trozo se dispuso individualmente en un solo pocillo (8 cm x 3 cm) de una cápsula de poliestireno de 4 pocillos (Nunc, catálogo #267061). La ATM hinchada con ácido se vertió sobre la malla hasta una profundidad de aproximadamente 5 mm y la cápsula se incubó durante una noche en atmósfera de nitrógeno. La malla recubierta de film, una vez secada, se desprendió de la cápsula, se hidrató durante 15 minutos en ácido acético 100 milimolar, se invirtió y se transfirió a un recipiente de poliestireno limpio. La ATM hinchada con ácido preparada recientemente se vertió de nuevo sobre la malla recubierta de film, que se secó luego durante una noche en atmósfera de nitrógeno. La malla doblemente recubierta y seca se retiró luego del recipiente de poliestireno.

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

Preparación de la malla de polipropileno recubierta de esponja. La ATM (2,5 mg ATM/cm² de malla de polipropileno) se lavó 3 veces en agua para eliminar el crioprotector y las sales residuales, después de lo cual se hinchó en ácido acético 100 mM a una concentración final de 5% ATM durante 3 horas a la temperatura ambiente. Se cortó malla de polipropileno (malla PROLENE, Ethicon, Inc.) en trozos de aproximadamente 7,5 cm x 2,5 cm y cada trozo se puso individualmente en un solo pocillo (8 cm x 3 cm) de una cápsula de poliestireno de 4 pocillos (Nunc, catálogo #267061). La ATM hinchada con ácido se vertió sobre la malla (2,5 mg de ATM/cm² de malla) hasta una profundidad de aproximadamente 5 mm. La ATM hinchada con ácido se vertió sobre la malla, que se liofilizó luego. La malla de poliestireno recubierta de esponja y secada se retiró luego del recipiente de poliestireno.

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

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

Resistencia a la tracción de los films y las esponjas. Se prepararon films y esponjas exactamente como se ha descrito en los métodos anteriores, excepto que se omitió de las muestras la malla de polipropileno. Los films y las esponjas se rehidrataron y se evaluó su resistencia a la tracción utilizando una máquina de ensayos Instron 5865 (Instron Corporation, Norwood, MA.) conforme a las especificaciones del productor. Los resultados de este experimento se muestran a continuación en la Tabla 2. Los valores representan el estrés medio máximo de dos muestras separadas. Los films reticulados tenían la resistencia global máxima y toleraban aproximadamente 20-25% del estrés máximo tolerado por la ATM normal liofilizada (Xenoderm™).

Tabla 2: resistencia a la tracción de los films y esponjas dérmicos

Muestra	Reticulación	Estrés máxima (MPa)
Film	No	0,07
Esponja	No	0,02
Film	Sí	4,05
Esponja	Sí	0,09
Hoja normal Xenoderm™	No	15-20

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

Tabla 3: Temperatura de desnaturalización de los films y esponjas dérmicos

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

Análisis histológico de la malla de polipropileno recubierta de film y esponja. Se prepararon muestras de malla de polipropileno recubiertas con film y esponja como se ha descrito arriba, se cortaron luego y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E). Un material eosinofílico denso rodeaba la malla de polipropileno en las muestras de malla recubiertas con film; en contraste, un retículo flojo de material eosinofílico rodeaba la malla de polipropileno en las muestras de malla recubiertas con esponja. Los haces de colágeno, encontrados típicamente en la matriz dérmica, no se observaban en las muestras de malla de polipropileno recubiertas con film o esponja, aunque se apreciaban artefactos histológicos asociados con la parafina embebida en la malla, lo que sugería la necesidad de imbibición en el plástico antes del seccionamiento.

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

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

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

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

Ejemplo 4: Preparación de malla de polipropileno y films dérmicos utilizando un método de secado térmico

La malla de polipropileno recubierta de film utilizada en los Ejemplos 7, 10 y 11 y los films dérmicos utilizados en los Ejemplos 5, 6, 7, 8, y 9 se prepararon como sigue.

Preparación de la malla de polipropileno recubierta de film. Se micronizó hoja XenoDerm™ liofilizada conforme al método descrito anteriormente. Se lavó ATM en agua para eliminar el crioprotector y las sales residuales, y se hinchó luego en ácido acético 100 mM a una concentración final de 0,5% ATM durante 3 horas. Las temperaturas de hinchamiento abarcaban desde 32 a 40°C como se detalla en los Ejemplos específicos que siguen. La ATM hinchada con ácido se vertió en una cápsula de poliestireno y la malla de poliestireno (trozos de 7,5 cm x 2,5 cm) se sumergió en la solución de ATM hasta una profundidad de aproximadamente 1 cm; se utilizaron 0,75 mg de ATM hinchada con ácido por cm² de malla de polipropileno. La malla de polipropileno se recubrió una sola vez. Las muestras se secaron como se indica más adelante en los Ejemplos 7, 10 y 11.

Preparación de los films dérmicos. Se prepararon films dérmicos, que no contenían malla de polipropileno, como sigue. Se micronizó hoja XenoDerm™ liofilizada conforme al método arriba descrito. Se lavó ATM en agua para eliminar el crioprotector y las sales residuales, y se hinchó luego en ácido acético 100 mM a una concentración final de 0,5 % ATM durante 3 horas. Las temperaturas de hinchamiento oscilaban desde 32 a 40°C como se detalla en los Ejemplos específicos que siguen. La solución de ATM hinchada con ácido se vertió en una cápsula de poliestireno hasta una profundidad de aproximadamente 0,5 cm; se utilizaron 0,75 mg de ATM hinchada con ácido por cm² de la cápsula de poliestireno. Las muestras se secaron como se indica a continuación en los Ejemplos 5, 6, 8, y 9.

Ejemplo 5: Temperatura de desnaturalización de la matriz extracelular de los films dérmicos.

Se prepararon films dérmicos como se describe en el Ejemplo 4 anterior utilizando ATM que se había hinchado a la temperatura ambiente; los films se secaron en un ambiente de nitrógeno a la temperatura ambiente o en un bloque de calentamiento a 33°C, 37°C, o 43°C. Se incluyeron como control positivo films que se habían preparado usando el método de reticulación descrito en el Ejemplo 3. Los perfiles de desnaturalización de la matriz extracelular de los materiales resultantes se evaluaron por calorimetría de barrido diferencial (DSC). Como se indica en la Tabla 5, las temperaturas de desnaturalización de los films secados a 33°C y 37°C eran similares a las de films de control que se habían secado a la temperatura ambiente, mientras que la temperatura de desnaturalización de los films secados a 43°C era reducida con relación a los films de control. La reticulación parecía aumentar la temperatura requerida para desnaturalizar la matriz de colágeno. Estos datos sugerían que, como la temperatura de desnaturalización de los films era mayor que la temperatura corporal normal de los mamíferos de 37°C, los films serían estables a las temperaturas fisiológicas.

Tabla 5: Desnaturalización térmica de los films dérmicos

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

Ejemplo 6: Sensibilidad de los films dérmicos a las colagenasas.

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

Tabla 6: Sensibilidad de los films dérmicos a las colagenasas: porcentaje de colágeno remanente a lo largo del tiempo.

Tiempo de digestión con colagenasa (Horas)	Temperatura de secado de la Muestra (°C)				
	Temperatura ambiente	33	37	43	Temperatura ambiente, reticulada
1	64%	30%	45%	8%	90%
2	25%	12%	18%	5%	92%
4	15%	10%	15%	10%*	93%
6	10%	20%*	18%*	20%*	92%
24	0%	2%	0%	15%*	80%
Los porcentajes se refieren a porcentajes de colágeno remanentes en la muestra después del tratamiento con colagenasa					

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

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

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

Tabla 7: Diseño Experimental del Estudio de Biocompatibilidad

Muestra	Malla de polipropileno	Temperatura de hinchamiento (°C)	Temperatura de secado (°C)
A	no recubierta	no aplicable	no aplicable

Muestra	Malla de polipropileno	Temperatura de hinchamiento (°C)	Temperatura de secado (°C)
B	recubierta	RT ^a	RT ^a
C	recubierta	RT ^a	37°
D	recubierta	RT ^a	40°
E	recubierta	37°	RT ^a
F	recubierta	40°	RT ^a
a. RT= temperatura ambiente			

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

Ejemplo 8: Análisis bioquímico de los films dérmicos

Se evaluó el efecto de la temperatura de preparación sobre la composición bioquímica de los films dérmicos. Resumidamente, se prepararon films dérmicos, como se describe en el Ejemplo 5, con ATM que se había hinchado en ácido acético 0,1 M a la temperatura ambiente, 32°C, 37°C, o 40°C; los films se secaron a la temperatura ambiente. La composición bioquímica de los films dérmicos resultantes se comparó con la de la ATM micronizada.

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

Tabla 8: Distribución de hidroxiprolina (%) en los films dérmicos

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

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

El colágeno solubilizado con pepsina obtenido a partir de las muestras de film dérmico se analizó por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE). La SDS-PAGE se realizó conforme a métodos estándar. Se compararon muestras de colágeno tipo I purificado, colágeno tipo III purificado, colágeno solubilizado con pepsina procedente del material de partida de ATM hidrolizada, y colágeno solubilizado con pepsina procedente de films dérmicos preparados con ATM que se había hinchado en ácido acético 0,1 M a la temperatura ambiente, 32°C, 37°C, o 40°C. No se observaron en ningún caso diferencias cualitativas, tales como, por ejemplo, diferencias debidas a reticulación o degradación del colágeno, en los perfiles de colágeno entre la ATM micronizada y cualquiera de las muestras de film dérmico. La ATM micronizada y las muestras de film dérmico estaban compuestas fundamentalmente de colágenos tipo I y tipo III.

Análisis de proteoglicanos (decorina). Se extrajeron los proteoglicanos del material de partida de ATM micronizada y de films dérmicos preparados con ATM que se había hinchado en ácido acético 0,1 M a la temperatura ambiente, 32°, o 37°C. Los proteoglicanos se resolvieron por SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana para inmunotransferencia. La inmunotransferencia se realizó conforme a métodos estándar. La membrana se sondó con un anticuerpo policlonal específico de decorina. En todas las muestras eran detectables niveles comparables de decorina; no se apreció evidencia alguna de degradación o reticulación.

Análisis de glicosaminoglicanos. Los glicosaminoglicanos se extrajeron del material de partida de ATM micronizada y de films dérmicos preparados con ATM que se había hinchado en ácido acético 0,1 M a la temperatura ambiente, 32°C, 37°C, o 40°C. Los glicosaminoglicanos se resolvieron por electroforesis en acetato de celulosa conforme a métodos estándar. En todas las muestras eran detectables ácido hialurónico y sulfato de condroitina, y no se observó diferencia cualitativa alguna en los perfiles de glicosaminoglicanos.

Ejemplo 9: Análisis Biomecánico de los Films Dérmicos

Se evaluó el efecto de la temperatura de preparación sobre las propiedades biomecánicas de los films dérmicos. Resumidamente, se prepararon films dérmicos con ATM que se había hinchado en ácido acético 0,1 M a la temperatura ambiente, 32°C, 37°C, o 40°C, como se describe en el Ejemplo 5, se secaron en atmósfera de nitrógeno, y se sometieron tiras de 1 cm de los films dérmicos a ensayos de tracción utilizando una máquina de ensayos Instron 5865 (Instron Corporation, Norwood, MA). Los datos presentados en la Tabla 9 indican que los films preparados con ATM que se había hinchado a temperaturas elevadas tenían una resistencia a la tracción mayor con relación a los films que se habían preparado con ATM que se había hinchado a la temperatura ambiente. La temperatura óptima para alcanzar un máximo en las propiedades biomecánicas era aproximadamente 37°C. Así, por ejemplo, la tensión máxima para los films preparados con malla que se había hinchado a la temperatura ambiente era $0,017 \pm 0,007$ MPa; el valor correspondiente para los films preparados con malla que se había hinchado a 37°C era $0,123 \pm 0,009$ MPa. El módulo de Young para los films preparados con malla que se había hinchado a la temperatura ambiente era $9,25 \pm ,096$ MPa; el valor correspondiente para los films preparados con malla que se había hinchado a 37°C era $46,0 \pm 3,00$ MPa. La carga máxima para los films preparados con malla que se había hinchado a la temperatura ambiente era $0,056 \pm 0,002$ N; el valor correspondiente para los films preparados con malla que se había hinchado a 37°C era $0,337 \pm 0,024$ N. La deformación porcentual para los films preparados con malla que se había hinchado a la temperatura ambiente era $21,1 \pm 1,0$ %; el valor correspondiente para los films preparados con malla que se había hinchado a 37°C era $49,3 \pm 3,5$ %.

Tabla 9: Propiedades Biomecánicas de los Filmes Dérmicos

Parámetro	Muestra			
	ATM hinchada con ácido (RT)	ATM hinchada con ácido (32°C)	ATM hinchada con ácido (37°C)	ATM hinchada con ácido (40°C)
Estrés máxima (MPa)	$0,017 \pm 0,007$	$0,094 \pm 0,025$	$0,123 \pm 0,009$	$0,082 \pm 0,024$
Módulo de Young (MPa)	$9,25 \pm ,096$	$39,00 \pm 9,00$	$46,0 \pm 3,00$	$29,73 \pm 8,88$
Carga Máxima (N)	$0,056 \pm 0,002$	$0,291 \pm 0,087$	$0,337 \pm 0,024$	$0,214 \pm 0,062$
Deformación porcentual	$21,1 \pm 1,0$	$46,6 \pm 3,0$	$49,3 \pm 3,5$	$48,5 \pm 3,4$

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

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

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

Se crearon defectos de escisión (aproximadamente 1,5 cm x 2,5 cm) en el abdomen de las ratas y se repararon con malla de polipropileno o malla de hernias híbrida utilizando una técnica de refuerzo sin tensión. Los defectos se crearon por retirada de un trozo de forma ovalada del tejido de fascia utilizando tijeras. Se insertaron los artículos de malla de test en el defecto y se ligaron en el borde de la herida utilizando 6 suturas espaciadas uniformemente. El estudio utilizó 16 ratas, recibiendo 8 ratas implantes de polipropileno y 8 ratas implantes de malla híbrida. Se analizaron cinco ratas de cada grupo 4 semanas después de la implantación y las 3 ratas restantes 8 semanas después de la implantación. Para el análisis, se recogieron explantes y sometieron a evaluación macroscópica e histológica. El recubrimiento porcentual del área de la superficie fue estimado por un investigador que desconocía la identidad de cada muestra. Se observaron adhesiones omentales extensas después de inspección de los explantes de polipropileno (implicación aproximada de 65 % del área de la superficie); las adhesiones omentales generadas por los explantes de malla recubiertos implicaban sólo aproximadamente 18% del área de la superficie. Adicionalmente, se observaron adhesiones viscerales (hígado e intestino) en dos de los animales reparados con malla de polipropileno, y estaban ausentes en los animales reparados con la malla híbrida. Se observaron indicadores de una respuesta regenerativa, que incluía repoblación de células, revascularización, inflamación mínima y persistencia del injerto. Después del análisis histológico de las muestras de malla híbrida a las 4 semanas después de la implantación. Todos los artículos de test recubiertos (con la excepción de dos muestras que contenían infecciones activas) se caracterizaban por repoblación con células semejantes a fibroblastos, revascularización, inflamación mínima y persistencia del recubrimiento biológico. En contraste, los artículos de test de polipropileno estaban asociados con una mayor respuesta celular alrededor de las fibras de polipropileno consistente con una respuesta agresiva de cuerpo extraño a los artículos de test de malla implantados.

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

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

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

REIVINDICACIONES

1. Un método de producción de una composición de malla biocompatible, comprendiendo el método:
 - a) incubar una pluralidad de fragmentos de una matriz de tejido acelular (ATM) en una solución ácida para crear una suspensión homogénea de fragmentos de ATM hinchados, en donde la solución ácida tiene un pH menor que 3,0 y no causa desnaturalización irreversible sustancial de las fibras de colágeno en la ATM;
 - b) aplicar la suspensión homogénea a un sustrato de malla biocompatible para crear un sustrato de malla recubierto; y
 - c) secar el sustrato recubierto para formar una composición de malla.
2. El método de la reivindicación 1, en el cual los pasos (a) y (b) se realizan simultáneamente.
3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el cual la matriz de tejido acelular (ATM) comprende un tejido del cual se han eliminado todas, o sustancialmente todas las células viables, seleccionándose el tejido del grupo constituido por dermis, fascia, tejido pericárdico, duramadre, tejido del cordón umbilical, tejido placentario, tejido de válvula cardíaca, tejido de ligamento, tejido de tendón, tejido arterial, tejido venoso, tejido conectivo neural, tejido de vejiga urinaria, tejido de uréter, y tejido intestinal.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el cual la solución ácida es una solución que comprende un ácido seleccionado del grupo constituido por ácido acético, ácido ascórbico, ácido bórico, ácido carbónico, ácido cítrico, ácido clorhídrico, ácido láctico, ácido tánico, ácido fosfórico, y ácido sulfúrico.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el cual el sustrato de malla es absorbible.
6. El método de la reivindicación 5, en el cual la malla absorbible es un polímero seleccionado del grupo constituido por polihidroxiclcanoato, ácido poliglicólico, ácido poli-1-láctico, ácido poliláctico/poliglicólico (PLGA), poliglactina 910, y carboximetilcelulosa, o comprende poli-4-hidroxibutirato.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el cual el sustrato de malla es un sustrato sintético.
8. El método de la reivindicación 7, en el cual el sustrato sintético comprende polipropileno.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el cual el secado comprende secado en atmósfera de nitrógeno o comprende liofilización.
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende adicionalmente incubar la suspensión homogénea de ATM a una temperatura de 20°C a 42°C.
11. Una composición de malla biocompatible producida por el método de cualquiera de las reivindicaciones 1-10.
12. Una composición de malla biocompatible que comprende:

un sustrato de malla recubierta, en el que el recubrimiento del sustrato de malla comprende una suspensión de ATM seca, en el que la suspensión de ATM comprende una pluralidad de fragmentos de ATM hinchados en una solución ácida, en el que la solución ácida tiene un pH menor que 3,0, y no causa desnaturalización irreversible sustancial de las fibras de colágeno en la ATM.
13. La composición de la reivindicación 12, en la cual los fragmentos de ATM se incuban a una temperatura de 30°C a 42°C.
14. La composición de malla biocompatible de la reivindicación 12 o la reivindicación 13 para uso en la mejora o reparación de un órgano o tejido en un individuo mamífero.
15. La composición de la reivindicación 14, en la cual el órgano o tejido a tratar o reparar se selecciona del grupo constituido por tejido de la pared abdominal, músculo abdominal, y tejido muscular liso.
16. La composición de la reivindicación 14 con la reivindicación 15 para uso en la reparación de un defecto seleccionado del grupo constituido por una hernia inguinal, una hernia femoral, una hernia ventral, una hernia abdominal, una hernia incisional, una hernia de hiato, una hernia de diafragma, una hernia umbilical, debilidad fascial en el tórax, debilidad fascial en la pared abdominal, y prolapso de órgano pélvico.