

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 585 483**

51 Int. Cl.:

A61F 2/08 (2006.01)

A61L 27/48 (2006.01)

A61L 27/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.02.2009 E 09710120 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.05.2016 EP 2249891**

54 Título: **Mejora molecular de la matriz extracelular y métodos de uso**

30 Prioridad:

13.02.2008 US 65527

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

06.10.2016

73 Titular/es:

**THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION (100.0%)
9500 Euclid Avenue
Cleveland, OH 44195, US**

72 Inventor/es:

**DERWIN, KATHLEEN, ANNE;
IANNOTTI, JOSEPH, PATRICK;
CHIN, LIKANG y
CALABRO, ANTHONY**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 585 483 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

Mejora molecular de la matriz extracelular y métodos de uso

5 Antecedentes de la invención

10 El manguito de los rotadores comprende cuatro músculos que controlan el movimiento del hombro y sus tendones asociados por los que los músculos están unidos a la cabeza humeral (el extremo del húmedo que forma parte de la articulación del hombro). Junto con la cápsula articular, estos músculos y tendones forman un manguito que rodea la cabeza del húmero. Los tendones son estructuras gruesas tipo cinta que tienen alta resistencia a la tracción. No solo mantienen juntos los músculos del hombro y el húmero, sino que también transmiten fuerzas ejercidas por aquellos músculos para inducir el movimiento correspondiente del húmero. En un sujeto sano, los tendones están completamente unidos en un extremo a, y envuelven, una porción de la superficie de la cabeza humeral. Cuando se produce el desgarro de un manguito de los rotadores, la cápsula articular y uno o más de los tendones llega(n) a separarse parcialmente o completamente de la cabeza humeral, creando tanto una condición dolorosa como funcionalmente debilitante.

20 El actual tratamiento para los desgarros del manguito de los rotadores es suturar el tendón roto de nuevo al hueso de la cabeza humeral. Las suturas mantienen el tendón en contacto con el hueso, preferentemente durante un tiempo suficiente para que el tendón se consolide al hueso y forme un puente que restablecerá la conexión tendón-hueso y restaurará la función normal. Las suturas que se usan poseen resistencia a la tracción suficiente para retener el tendón y el hueso juntos durante el proceso de consolidación. Sin embargo, el tendón es un tejido fibroso que puede ser rasgado por las suturas. Comúnmente, las suturas se alinearán con la estructura fascicular del tendón y la destrozarán bajo fuerza de tracción suficiente, arruinando así la reparación quirúrgica antes de que se complete la consolidación del tendón al hueso. Las suturas también pueden desgarrarse a través del hueso bajo fuerza suficiente, particularmente en sujetos mayores que forman la mayor parte de los pacientes con desgarro del manguito de los rotadores y cuyos huesos tienden a ser más osteoporóticos.

30 El documento WO 03/007787 A2 desvela MEC impregnada con HA como material de andamiaje para la reparación de tejido.

35 En realidad, los desgarros del manguito de los rotadores afectan al 40 % o más de aquellos por encima de la edad de 60 y cuesta a la economía de los EE.UU. aproximadamente 3 billones de dólares al año. La tasa de fallo en las reparaciones de desgarros del manguito de los rotadores de grandes a considerables oscila del 20 al 90 %. Las altas tasas de volver a desgarrarse son un resultado de factores mecánicos (por ejemplo, tamaño del desgarro, técnica de reparación, protocolo de rehabilitación), además de factores biológicos (por ejemplo, edad, cronicidad del desgarro, calidad del tendón, enfermedad) que puede comprometer la capacidad intrínseca de los pacientes para consolidarse. Todos estos factores pueden también contribuir a la tendencia de las suturas a desgarrarse a través de tendón y hueso antes de completarse la consolidación, contribuyendo así a la tasa de volver a desgarrarse. Por tanto, existe la necesidad de estrategias de reparación que proporcionen resistencia adecuada, además de que estimulen y potencien el potencial de consolidación.

Breve resumen de la invención

45 Se proporciona una composición que incluye matriz extracelular derivada de ser humano o de animal que tiene incorporada en su interior una red macromolecular que comprende macromoléculas de policarboxilato, poliamina o polihidroxifenilo que han sido reticuladas mediante enlaces dihidroxifenilo, estando dicha red macromolecular conectada dentro de dicha matriz extracelular derivada.

50 También se proporciona un método de preparación de una composición implantable. El método incluye impregnar una matriz extracelular derivada de ser humano o animal con macromoléculas de hialuronano que tienen grupos laterales hidroxifenilo sustituidos en ella; y a partir de aquí hacer reaccionar los grupos laterales hidroxifenilo para formar enlaces dihidroxifenilo, incorporando así una red macromolecular reticulada de hialuronano que se conecta dentro de la matriz extracelular.

55 También se proporciona un método de refuerzo de una reparación de tejido, o de reparación de un defecto o hueco de tejido. El método incluye proporcionar un parche que comprende una matriz extracelular derivada de ser humano o animal que tiene impregnada en su interior macromoléculas de policarboxilato o poliamina que tienen grupos laterales hidroxifenilo sustituidos en ella; hacer reaccionar los grupos laterales hidroxifenilo para formar enlaces dihidroxifenilo, incorporando así una red macromolecular reticulada de dichas macromoléculas de policarboxilato o poliamina que se conecta dentro de la matriz extracelular; identificar un defecto o hueco de tejido apropiado en tejido animal o humano *in vivo*; y aplicar el parche para tanto reforzar la reparación de tejido como cubrir el defecto o hueco de tejido.

65 También se proporciona un parche para reforzar una reparación de tejido, o reparar un defecto o hueco de tejido. El parche incluye una matriz extracelular derivada de ser humano o animal que tiene impregnada en su interior una red

macromolecular de macromoléculas de policarboxilato o poliamina que han sido reticuladas mediante enlaces dihidroxifenilo. La red macromolecular se incorpora y se conecta dentro de la matriz extracelular. En realizaciones preferidas, la matriz extracelular derivada es fascia lata y las macromoléculas son moléculas de hialuronano que han sido sustituidas con tiramina y reticuladas mediante enlaces ditiramina.

- 5 Breve descripción de los dibujos
- La FIG. 1 es un diagrama esquemático de un parche de matriz extracelular aplicado sobre un sitio de reparación de hueso a tendón para reforzar la reparación.
- 10 La FIG. 2 es una fórmula estructural de una molécula de hialuronano.
- La FIG. 3 es un diagrama esquemático de una realización de una red macromolecular reticulada de dihidroxifenilo.
- La FIG. 4 es un diagrama esquemático de un parche de matriz extracelular aplicado para reparar un defecto de tejido entre tendón y hueso, que conecta el hueco entre el tendón y el hueso en lo que de otro modo sería un desgarro irreparable.
- 15 La FIG. 5 es una serie de dos fotografías que muestra la distribución de HA en MEC de fascia (A) tratada con agua y (B) tratada con HA sustituido con tiramina seguido de reticulación, como se describe en el Ejemplo 1.
- La FIG. 6 es una serie de tres fotografías que muestra secciones histológicas representativas de injertos de matriz extracelular de fascia tras la implantación en el modelo de pared abdominal de la rata durante cuatro semanas (tinción con hematoxilina y eosina, 10X), en el que la fascia estuvo (A) sin tratar, (B) se trató con HA y (C) se trató con TS-HA, seguido de reticulación, como se describe en el Ejemplo 4.
- 20

Descripción detallada de realizaciones preferidas de la invención

25 A continuación se describen realizaciones de ejemplo y se ilustran en los dibujos. Estas realizaciones no pretenden ser limitaciones. Por ejemplo, pueden utilizarse uno o más aspectos en otras realizaciones e incluso otros dispositivos o métodos.

30 Actualmente, están siendo investigados los parches de matriz extracelular ("MEC") para la reparación del manguito de los rotadores basándose en el fundamento de que pueden proporcionar un andamiaje natural y mecánicamente robusto que refuerza la reparación, guía la infiltración de células del huésped y promueve la formación de una conexión tendón-hueso funcional. La matriz extracelular es la parte extracelular que existe de forma natural de tejido animal o humano que puede proporcionar soporte estructural a las células, además de realizar diversas otras funciones. Los parches y métodos desvelados en el presente documento utilizan MEC derivada de ser humano o animal que se procesa y opcionalmente se corta dentro de un parche, y aumenta *ex vivo* para incorporar y conectar una matriz macromolecular reticulada para conferir propiedades beneficiosas. Más generalmente, como se usa en el presente documento, una MEC derivada de ser humano o animal, o simplemente 'MEC derivada', es un material de matriz extracelular que se escinde y recoge de un animal o ser humano, y luego se procesa con o sin tratamientos químicos adicionales u otros tratamientos *ex vivo* para proporcionar un parche que puede usarse para reparar (o reforzar la reparación de) un defecto o hueco de tejido en un animal o ser humano en necesidad de tal reparación. El huésped animal o humano que es la fuente de la MEC derivada puede o puede no ser el paciente que va a recibir el parche, hecho de MEC derivada, para reparar un defecto o hueco de tejido.

35

40

45 La MEC derivada puede clasificarse en dos amplias categorías: MEC derivada viable y MEC derivada no viable. En el presente documento, la MEC derivada viable se refiere a MEC derivada de ser humano o animal como se ha descrito anteriormente, que no se ha tratado para eliminar o destruir células vivas presentes o suspensas en la MEC. Por consiguiente, la MEC derivada viable retendrá células vivas del huésped de la MEC, que estaban presentes en su interior tras la recogida. La MEC derivada viable puede ser la elección preferida para preparar un parche de autoinjerto para auto-trasplante; es decir, si el defecto o hueco de tejido en necesidad de reparación está en el huésped del que se derivó la MEC. Alternativamente, la MEC derivada viable también puede preferirse en el caso de un huésped de MEC derivada que ha sido tipificado por tejido y es coincidente con el paciente en necesidad de la reparación, para proporcionar un parche de aloinjerto para alotrasplante. La MEC derivada viable puede derivarse de un huésped vivo, y usarse inmediatamente (opcionalmente incluso intra-operatoriamente) para reparar un defecto o hueco de tejido, tanto en el huésped de MEC como en otro sujeto. Alternativamente, la MEC derivada viable puede tipificarse por tejido y guardarse en banco hasta que se necesite, dependiendo de la capacidad para preservarla en un estado viable. En otra alternativa, la MEC derivada viable puede derivarse (por ejemplo, donarse) de un huésped recién muerto, en el que las células presentes en la MEC todavía no han muerto.

50

55

60 En el presente documento, la MEC derivada no viable se refiere a MEC derivada de ser humano o animal como se ha descrito anteriormente, que ha sido tanto tratada para eliminar o destruir células vivas presentes cuando se recoge de un huésped viable o recién muerto, como para eliminar los componentes de células necróticas presentes cuando se recoge de tejidos cadavéricos después de un periodo de tiempo tras la muerte. La MEC derivada no viable puede ser la opción preferida en circunstancias en las que haya riesgo de inducción de una respuesta inmunitaria inaceptable o no deseable en el receptor de un parche hecho con la MEC derivada, basado en la presencia de células vivas extrañas. Alternativamente, la MEC derivada no viable puede preferirse cuando se desea incorporar células específicas de fuente y concentración conocidas dentro del parche que va a formarse a partir de la MEC derivada, por ejemplo, células de autoinjerto. La MEC derivada no viable también puede preferirse debido a

65

que es generalmente más fácil de obtener en comparación con la MEC derivada viable. Además de obtener MEC no viable de seres humanos o animales cadavéricos, también puede prepararse tratándose de otro modo MEC derivada viable con agentes apropiados o técnicas para destruir y eliminar las presentes células vivas antes de uso.

5 Los parches descritos en el presente documento, hechos de o sustancialmente de MEC derivada, se aplican para reparar un defecto o hueco de tejido, o para reforzar tal reparación. Como se usa en el presente documento, un defecto o hueco de tejido es un espacio entre tejidos de un paciente (animal o ser humano), o entre porciones adyacentes del mismo tejido, que se desea unir juntas. Un defecto o hueco de tejido puede estar formado de un desgarro o separación de tejidos que una vez estuvieron unidos, tal como cuando un tendón se desgarra o se desprende del hueso asociado, o cuando se forma una perforación (tanto traumáticamente como mediante una enfermedad u otro proceso natural) en el tejido, tal como una úlcera.

15 En el presente documento se desvelan parches hechos de MEC derivada y sus métodos de uso para reparar o reforzar la reparación de un defecto o hueco de tejido. La fascia lata es una forma de MEC derivada útil para preparar los parches descritos en el presente documento. La fascia lata puede derivarse de ser humano o animal. Es particularmente interesante para aplicaciones descritas en el presente documento, especialmente para reforzar reparaciones de tendón al hueso, debido a que sus propiedades químicas, estructurales y de material son similares al tendón. La fascia lata tiene así buena resistencia a la tracción, una propiedad importante para retener juntos tejidos rasgados o perforados. En realizaciones preferidas, un parche usado para reforzar o reparar un defecto o hueco de tejido está compuesto por, o principalmente por, fascia lata. Cuando se usa para reparar defectos en seres humanos, la fascia lata es preferentemente fascia lata humana, que está fácilmente disponible como tejido de aloinjerto de bancos de tejido. Alternativamente, la fascia lata de otros animales puede usarse en seres humanos, que incluye fascia lata derivada de, por ejemplo, cerdos o vacas.

25 La FIG. 1 ilustra esquemáticamente un parche de MEC, tal como un parche de fascia lata como se prefiere en el presente documento, aplicado y cosido sobre un sitio de reparación de tendón a hueso. En la realización ilustrada, el tendón se repara inicialmente directamente al hueso del que se ha rasgado. Esto puede hacerse por técnicas convencionales, como por sutura. Posterior a esta reparación inicial, el parche hecho de MEC derivada se aplica sobre la reparación de tendón a hueso, y se une por separado a tejidos intactos localizados en lados opuestos del sitio de reparación. De este modo, el parche proporciona refuerzo adicional a la reparación y disminuye las fuerzas a la tracción experimentadas por las suturas del tendón al hueso en el sitio de reparación. Así, se apreciará que con el uso de un parche de MEC apropiado y método de fijación quirúrgica, las suturas en el sitio de reparación (directamente unidas al tendón y hueso) pueden ser menos propensas a desgarrarse a través de tanto el tendón como el hueso. Como consecuencia, el tendón sigue opuesto al hueso de un modo que soporte la consolidación natural y la formación de una conexión tendón-hueso funcional. Debido a que la MEC de fascia lata tiene propiedades mecánicas similares al tendón, tiene las propiedades de material inherente para resistir a las fuerzas fisiológicas experimentadas durante la consolidación tendón-hueso.

40 Además de reforzar el sitio de reparación, se desea crear y promover un entorno propicio para la rápida consolidación, que debe reducir la cantidad de tiempo que las suturas deben sustentar la reparación, y a su vez reducir la tasa de volver a desgarrarse. Sería beneficioso un entorno que inhibiera la migración de células inflamatorias e indujera la migración de células no inflamatorias. El ácido hialurónico de alto peso molecular, también conocido como hialuronano y abreviado HA, cuya estructura básica se muestra en la FIG. 2, es una biomolécula ubicua que se sabe que desempeña una función crítica en la morfogénesis con innumerables funciones. Durante tanto la morfogénesis como la cicatrización fetal, se cree que los niveles persistentemente altos de HA de alto peso molecular promueven un estado intermedio de adhesión celular que permite cambios en la forma de la célula y la motilidad y/o el mantenimiento en el estado no diferenciado. Las heridas fetales tendrían abundante HA, inflamación mínima y consolidación sin formación de cicatrices. Basándose en estas cualidades favorables, el HA se ha investigado ampliamente en estrategias de reparación de tejido. Se sabe que el HA de alto peso molecular (>250 kDa) posee propiedades antiinflamatorias que conducen a la quiescencia celular y a la formación reducida de fibrosis/cicatrices. El HA de alto peso molecular puede modular la inflamación por interacción directa con células inflamatorias o creando un entorno viscoso que limita la migración de células inflamatorias y la difusión de citocinas. Sin embargo, cuando se degrada en fragmentos de peso molecular pequeño, se ha mostrado que el HA es pro-inflamatorio y angiogénico, estimulando la migración celular, producción de citocinas y formación de tejido fibrótico. Por tanto, en términos de eficacia terapéutica, el HA de alto peso molecular puede ser beneficioso tanto como un agente antiinflamatorio como una barrera protectora contra subproductos inflamatorios.

60 Según una realización, el HA de alto peso molecular (por ejemplo, ~1 MDa) se incorpora dentro de la MEC derivada para aumentar la MEC y proporcionar un parche mejorado en comparación con el uso de la MEC derivada sola. La MEC puede ser cualquier MEC derivada adecuada. Preferentemente, es MEC de fascia lata, y en el caso de reparar un defecto de tejido en un ser humano, preferentemente MEC de fascia lata humana. Alternativamente, la MEC derivada puede ser, por ejemplo, fascia lata de otros animales, o puede ser otros tipos de MEC, tales como MEC de dermis, MEC de la submucosa del intestino delgado, MEC de pericardio, etc. Todavía adicionalmente puede ser una combinación de materiales de MEC derivada. En realizaciones preferidas, el HA de alto peso molecular se incorpora dentro de la MEC derivada para preparar un producto de parche mejorado. El HA es preferentemente hialuronano sustituido con hidroxifenilo, más preferentemente hialuronano sustituido con tiramina (TS-HA), que puede

impregnarse primero en la MEC, y luego inmovilizarse dentro de la MEC por reticulación de los aductos, por ejemplo, los aductos de hidroxifenilo o tiramina, para formar reticulaciones, por ejemplo, enlaces dihidroxifenilo o ditiramina, produciendo así una red macromolecular de HA reticulado, como se muestra esquemáticamente en la FIG. 3, incorporada dentro de la MEC derivada. Por reticulación *in situ* dentro de la MEC, el HA impregnado se enmaraña dentro de la MEC y la red macromolecular de HA reticulada resultante queda atrapada y conectada en su interior. Además, la reticulación *in situ* permite el potencial de reticulación directa de aductos unidos por HA, por ejemplo tiramina, con residuos de tirosina sobre proteínas nativas dentro de la MEC derivada, para unir covalentemente la red de HA a estas proteínas. Tales proteínas pueden producirse naturalmente y ser retenidas en la MEC derivada, o pueden incorporarse por separado para lograr un efecto terapéutico deseado. Se ha mostrado que cuando aproximadamente el 5 % de los disacáridos presentes en las macromoléculas de hialuronano están sustituidos con tiramina, esto permite que TS-HA se reticule discretamente (o gelifique). La estructura, y supuestamente la actividad biológica, del TS-HA reticulado se mantiene, como se demuestra por la unión positiva de la proteína de unión a HA, como se muestra en la FIG 5 y se describe en más detalle en los ejemplos más adelante.

Los datos de los presentes inventores sugieren que la MEC de la fascia lata puede enriquecerse con TS-HA incorporado por al menos un orden de magnitud en comparación con el HA natural ya presente en la MEC de la fascia lata, usando métodos de difusión. Además, se ha encontrado que la fascia enriquecida en TS-HA posee elevada densidad celular en comparación con la fascia no tratada en un modelo de pared abdominal de la rata (descrito en los ejemplos más adelante). Los datos de los ejemplos también sugieren que la fascia enriquecida con TS-HA inmovilizado está asociada con inflamación menos crónica que la fascia no tratada en el modelo de rata. Juntos, estos resultados indican que la incorporación de una pequeña concentración (1-2 % de peso de tejido basado en MEC) de HA de alto peso molecular dentro de la MEC de la fascia lata crea un medio que potencia la infiltración celular y modula la inflamación - condiciones favorables para la incorporación de injerto y quizás no a diferencia de aquellos encontrados en el desarrollo fetal. Debe observarse que hasta ~1-2 % de carga (basado en la masa de tejido de la fascia inicial) ha sido obtenido mediante el método de difusión mencionado anteriormente y descrito más completamente en el presente documento más adelante. Sin embargo, se contempla que pueden obtenerse mayores tasas de carga de TS-HA mediante técnicas de carga más agresivas, por ejemplo, mediante vacío, centrifugación o electroporación. Los efectos anteriores, combinados con las propiedades de tracción de la fascia lata, soportan el uso de fascia enriquecida con TS-HA para la reparación de tendón al hueso en general, y la reparación del manguito de los rotadores en particular. Los presentes inventores esperan que el HA de alto peso molecular reduzca la inflamación y promueva la migración celular dentro de fascia, que promovería la integración del parche de la fascia con los tejidos huésped subyacentes. Como tal, el parche de la fascia proporcionaría refuerzo a la reparación de tendón al hueso durante la consolidación. Esto disminuiría la aparición de un nuevo desgarramiento tras la reparación. Los anteriores efectos de combinar HA con fascia lata para reforzar una reparación de tendón al hueso serán particularmente útiles en la reparación del manguito de los rotadores debido a las altas fuerzas de tracción observadas en la articulación del hombro durante las actividades posoperatorias y las malas tasas de consolidación biológica.

Se cree que el enriquecimiento de HA potenciará la respuesta del huésped a fascia tal que el aumento de las reparaciones del manguito de los rotadores con un parche de la fascia enriquecido en HA mejorará los resultados de la reparación con respecto a la reparación solo con sutura convencional o aumento con un parche que solo comprende fascia nativa. Se cree adicionalmente que el enriquecer la MEC de fascia con hialuronano (HA) de alto peso molecular exógeno - una molécula conocida por desempeñar una función crítica en la morfogénesis, reparación de heridas y modulación de la inflamación - puede mejorar la capacidad de la fascia para promover la formación de un puente tendón-hueso funcional en la reparación del manguito de los rotadores, potenciando la infiltración celular y modulando la inflamación.

El HA exógeno puede combinarse con la fascia lata para producir una MEC mejorada del material de la fascia lata. La fascia lata puede obtenerse, por ejemplo, a partir de bancos de tejido como se ha descrito anteriormente, además de otras fuentes. La fascia lata normalmente se suministra en forma descelularizada como un material de MEC no viable. Es un material muy denso, y puede cargarse con HA a ~1-2 % de la masa de tejido de fascia inicial total usando métodos de difusión. El HA añadido se distribuye por toda la profundidad del andamiaje de la fascia, principalmente alrededor de haces de fascículos grandes. Como se ha mencionado anteriormente, puede ser posible lograr mayor carga mediante técnicas alternativas y más agresivas, que incluyen vacío, centrifugación o electroporación.

Como se ha mencionado anteriormente, la fascia lata frecuentemente se obtendrá de bancos de tejido y otras fuentes comerciales. Estas fuentes pueden aplicar técnicas de procesamiento especiales o incluso patentadas para procesar la fascia lata antes de usarse. Todas estas técnicas pueden tener el efecto de hacer que el aloinjerto de fascia lata parezca modestamente extraño al sistema inmunitario del implantado. Se cree que la incorporación de pequeñas cantidades de HA de alto peso molecular dentro de la fascia lata (~1-2 % de la masa total de la MEC) enmascarará proteínas degradadas o dañadas que surgen del procesamiento y así reducirá la respuesta inmunitaria del implantado y potenciará la integración del parche.

El HA no reticulado de alto peso molecular difunde rápidamente fuera de la fascia *in vitro* (por ejemplo, en el plazo de 1-72 horas). Si el HA difunde rápidamente fuera de la fascia, no estaría presente para facilitar los efectos beneficiosos descritos anteriormente en un parche de fascia lata implantado (u otra MEC) durante el proceso de consolidación. Por tanto, el HA impregnado en la MEC aumenta para atraparlo en su interior de manera que quedará en el parche durante al menos un periodo de tiempo durante el proceso de consolidación del implante. El HA reticulado de alto peso molecular difunde fuera de la MEC de la fascia lata más lentamente que el HA no reticulado de peso molecular correspondiente. Un material de HA reticulado que se ha encontrado particularmente útil en la presente solicitud se prepara sustituyendo restos de tiramina sobre las cadenas de HA y entonces enlazando las tiraminas para formar enlaces ditiramina entre cadenas de HA, reticulando o gelificando así las moléculas de HA impregnadas para atraparlas e incorporarlas dentro de la matriz de la fascia. La composición y la química del HA reticulado con ditiramina preferida se desvela en las patentes de EE.UU. N.º 6.982.298, 7.368.502 y 7.465.766, cuyos contenidos se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad.

Brevemente, según las publicaciones incorporadas, puede prepararse un HA reticulado u otra red macromolecular de policarboxilato o poliamina mediante acoplamiento covalente de compuestos que contienen hidroxifenilo, que incluyen, pero no se limitan a, tiramina, mediante sus grupos amina primaria a grupos carboxilo sobre las macromoléculas de cadena larga mediante una reacción mediada por carbodiimida. Los grupos hidroxifenilo pueden añadirse a las macromoléculas periódicamente o al azar a lo largo de su longitud mediante una reacción química. En el presente documento, la macromolécula de cadena larga es preferentemente HA, que tiene grupos ácido carboxílico periódicos a lo largo de su longitud y se prefiere para facilitar varios efectos deseables (descritos anteriormente) más allá del uso de MEC derivada no aumentada sola como parche usado para reparar defectos del tejido. Los grupos hidroxifenilo se proporcionan como parte de moléculas más pequeñas que tienen grupos amina primaria que pueden unirse a los átomos de carbono carboxilo de un grupo ácido carboxílico sobre las macromoléculas de HA mediante la vía carbodiimida. Las reacciones se describen en detalle en las publicaciones incorporadas anteriormente.

Cuando se sustituye sobre una molécula de HA, los compuestos que contienen hidroxifenilo adecuados incluyen aquellos que tienen una amina primaria libre que puede usarse para modificar los materiales de andamiaje que tienen múltiples grupos CO₂ o periódicos, que incluyen tirosina (ácido 2-amino-3-(4-hidroxifenil)propiónico) y tiramina (tirosamina o 2-(4-hidroxifenil)etilamina).

La segunda etapa en la preparación de la red de HA reticulado es enlazar las macromoléculas sustituidas con hidroxifenilo mediante una estructura de enlace de dihidroxifenilo. En esta etapa, los grupos hidroxifenilo unidos a diferentes moléculas de HA se enlazan usando un reactivo de peróxido en presencia de una peroxidasa. De importancia, puede producirse algún enlace de dihidroxifenilo entre diferentes grupos hidroxifenilo unidos a la misma molécula. La peroxidasa en presencia de un peróxido diluido (preferentemente H₂O₂) es capaz de extraer el átomo de hidrógeno del hidroxilo fenólico de compuestos que contienen hidroxifenilo (tales como tiramina), dejando al oxígeno del hidroxilo fenólico con un único electrón sin compartir, un radical libre extremadamente reactivo. El radical libre isomeriza a uno de los dos carbonos en la posición orto equivalentes y entonces dos de tales estructuras se dimerizan para formar un enlace covalente que reticula eficazmente las estructuras, que después de la enolización genera un dímero de dihidroxifenilo, por ejemplo, un enlace dihidroxifenilo tal como un enlace ditiramina. Peróxidos adecuados incluyen peróxido de hidrógeno. La peroxidasa es preferentemente peroxidasa de rábano picante (HRP). Alternativamente, puede usarse cualquier otra enzima adecuada u otro agente que sea capaz de generar radicales libre para la reticulación de macromoléculas de cadena larga que contienen grupos hidroxifenilo. Considerando la enzima peroxidasa en más detalle, la peroxidasa puede tanto formar radicales hidroxifenilo requeridos para la reticulación mediante la interacción de grupos hidroxifenilo en el sitio activo enzimático para crear directamente los radicales deseados, como mediante generación de radicales superóxido, que entonces difunden de la enzima e interaccionan con grupos hidroxifenilo para generar los radicales deseados. Otros compuestos que tienen el potencial de producir el mismo efecto incluyen cualquier compuesto que contenga porfirina, que incluye la familia de peroxidasa, hemoproteínas, o los compuestos de clorina estructuralmente relacionados. También pueden usarse varios otros iniciadores de radicales libres para reticular las macromoléculas de cadena larga modificadas con hidroxifenilo, como se describe en detalle en las publicaciones incorporadas anteriormente.

Volviendo a los parches de MEC derivada aumentados desvelados aquí, preferentemente las moléculas de HA de alto peso molecular que van a incorporarse en la fascia lata u otra MEC derivada adecuada tienen un peso molecular promedio de 250 kDa o mayor, más preferentemente 500, 800 o 900 kDa o mayor, más preferentemente 1 MDa o mayor. Preferentemente, la tasa de sustitución de tiramina sobre las moléculas de HA es aproximadamente o inferior al cinco por ciento basado en los sitios de sustitución disponibles como se desvela en las publicaciones anteriormente mencionadas. Se desea que la sustitución de tiramina sobre las moléculas de HA se complete antes de impregnar la MEC derivada. Las macromoléculas de HA sustituidas del peso molecular deseado (preferentemente superior a 250 kDa como se observa anteriormente) se impregnan entonces dentro de la MEC derivada mediante una técnica adecuada, tal como difusión pasiva como se observa anteriormente. Posteriormente, una vez se ha logrado el grado deseado de carga de TS-HA (por ejemplo ~1-2 %), la MEC impregnada con TS-HA se sumerge en una solución que incluye peróxido de hidrógeno diluido y la enzima apropiada, por ejemplo HRP, para promover y facilitar la reacción de reticulación para generar enlaces dihidroxifenilo (por ejemplo, ditiramina),

para así conectar las macromoléculas de HA impregnadas para producir una red macromolecular conectada dentro de la MEC derivada. La sumersión descrita aquí puede hacerse tanto una vez el parche impregnado con TS-HA se ha cortado a las dimensiones deseadas para la reparación prevista, como puede hacerse usando una hoja más grande del material, que puede cortarse posteriormente al tamaño según se necesite para las reparaciones particulares.

Las bajas tasas de sustitución de tiramina descritas anteriormente permiten que el HA se reticule de forma discreta mientras que mantiene la mayoría de las moléculas de HA en su conformación nativa como se demuestra por la unión positiva de la proteína de unión a hialuronano (FIG. 5 descrita en los ejemplos más adelante). Además de preservar el HA dentro de la MEC derivada, la reticulación como se ha descrito anteriormente puede inhibir o suprimir la rotura de HA dentro de moléculas de peso molecular relativamente más bajo.

Hasta ahora se ha descrito el parche de MEC derivada aumentado por HA, conjuntamente con la FIG. 1, como que se aplica sobre una reparación quirúrgica existente para unir o volver a unir tejidos rasgados o separados adyacentes. Como ya se ha explicado, en esta realización, el parche sirve para reforzar la reparación quirúrgica directamente en el defecto, con beneficios adicionales realizados como resultado de incorporar la red de HA macromolecular reticulada en el parche. En una realización alternativa, el parche desvelado en el presente documento también puede usarse como material de enlace en el caso en el que el hueco entre tejidos separados o rasgados, tales como un tendón y el hueso asociado, sea demasiado grande para repararse convencionalmente, por ejemplo, mediante sutura directa de los tejidos. Esto puede ocurrir, por ejemplo, cuando ya no hay tejido nativo suficiente para cerrar el desgarro o hueco para poner porciones opuestas en contacto para la sutura. En una realización mostrada esquemáticamente en la FIG. 4, un parche de MEC derivada, preferentemente aumentado con HA impregnado y reticulado como se ha descrito anteriormente, se incorpora en la interfase hueso-tendón y se fija en ambos de sus extremos respectivos para conectar un hueco que de otro modo es demasiado ancho para ser reparado convencionalmente. En esta realización, el parche de MEC derivada se integrará el mismo en tanto el hueso como el tendón para actuar de conexión sustituta de tendón-hueso, esencialmente reparar lo que tradicionalmente habría sido un hueco o desgarro irreparable. Debido a que la fascia lata tiene propiedades muy similares al tendón, ya es muy adecuada para funcionar en esta función como la MEC derivada del parche. Además, el HA atrapado (reticulado) puede promover la integración de fascia lata al hueso y/o al tendón por motivos ya tratados, que facilitaría la formación de un puente funcional.

Aunque la MEC impregnada con HA de la fascia lata se ha descrito principalmente con respecto a la reparación del manguito de los rotadores, se apreciará que métodos similares y materiales como se describen aquí también podrían adaptarse a otras reparación de tendón del hueso, reparaciones de otros tejidos conjuntivos (tales como ligamentos o ligamento al hueso), reparaciones de tejido blando tales como reparación de músculos lacerados o transferidos, además de otras reparaciones en las que un defecto o hueco de tejido se ha producido tanto mediante lesión (tal como una hernia) como quirúrgicamente. En estos casos, una matriz de MEC derivada impregnada con HA e incorporada (mediante reticulación), tal como fascia lata, que puede prepararse y suministrarse en forma de un parche que tiene dimensiones apropiadas, puede aplicarse sobre el defecto (por ejemplo, desgarro) tanto para formar un puente de tejido que puede incorporarse y remodelarse mediante la propia respuesta de consolidación del implante dentro de tejido apropiado para completar la reparación, como para reforzar una reparación quirúrgica entre los tejidos adyacentes mientras se consolida. La presencia del HA de alto peso molecular atrapado en la MEC derivada debe potenciar la respuesta de remodelación del implante para incorporar la MEC derivada (por ejemplo, fascia) dentro de tejidos nativos, y debe suprimir una respuesta inflamatoria que puede interferir con la consolidación.

Aunque el parche de MEC derivada que tiene HA impregnado y reticulado pueden reforzar un sitio de reparación, la reparación todavía puede ser propensa a fallo antes de que se produzca la consolidación biológica debido a las suturas que se desgarran tanto a través del tendón como el hueso, o a través del propio material de MEC (tal como la fascia lata). Por tanto, también son deseables etapas adicionales para inducir la integración funcional en el sitio de reparación tan rápidamente como sea posible, independiente de las suturas. La aplicación de estas etapas puede ser deseable para reparaciones como se representa esquemáticamente en las FIG. 1 y FIG. 4. Para este fin, se cree que un gel hecho de tiramina-colágeno reticulado serían útil, por ejemplo, si se inyecta entre el parche de MEC y el tejido subyacente que va a repararse, o entre el tendón del implantado y el hueso u otro tejido separado en el sitio de reparación, mientras que se sutura o después de que la sutura sea completa. Al igual que el HA, el colágeno es una molécula de policarboxilato capaz de sustituirse con tiramina u otros grupos hidroxifenilo para facilitar el enlace ditiramina (dihidroxifenilo). Química apropiada se describe en detalle en las publicaciones incorporadas anteriormente. La forma del colágeno que va a sustituirse con tiramina oscila de colágeno recombinante altamente purificado a colágeno que es un componente de un extracto de tejido tal como gelatina. Para preparar un gel de colágeno adecuado para la presente solicitud, se usa preferentemente colágeno que tiene un peso molecular promedio superior a 50 kDa, más preferentemente 100 kDa. En esta realización, el colágeno sustituido con tiramina ("TS-colágeno") se reticula preferentemente *in situ* entre los tejidos suturados opuestos que permiten que el TS-colágeno penetre en tejidos opuestos a medida que se reticula. El TS-colágeno se reticularía entonces (o gelificaría) alrededor de los tejidos existentes y posiblemente se reticularía con residuos de tirosina existentes dentro de los tejidos de un modo similar a la integración de TS-HA con proteínas que pueden estar presentes dentro de la MEC de la fascia lata, o dentro de otra MEC derivada en el parche como se ha descrito anteriormente. El uso de TS-colágeno

puede optimizar de este modo la integración de los tejidos opuestos, sirviendo de tanto un pegamento como posiblemente de un agente inductivo para la reparación.

Aunque la reticulación de tanto el HA como el colágeno descrito en el presente documento se logra preferentemente mediante enlaces ditiramina como se ha mencionado anteriormente y descrito más completamente en las publicaciones incorporadas, se contempla que también pueden usarse otros enlaces dihidroxifenilo, por ejemplo, mediante sustitución y enlace mediado por carbodiimida de aductos de hidroxifenilo adecuados sobre las cadenas de HA o de colágeno. Esto también se describe adicionalmente en las publicaciones incorporadas. La incorporación directa de células, biología y otros principios activos (tales como fármacos u otros compuestos terapéuticos) dentro de las redes macromoleculares de TS-HA o TS-colágeno para inducir la consolidación también se contempla como se describe en las publicaciones incorporadas.

Aunque los presentes métodos y parche se describen principalmente con respecto a aumentar la MEC de la fascia lata como la MEC derivada como se desvela en el presente documento, debe reconocerse que los métodos y composiciones descritos en el presente documento pueden aplicarse análogamente para incorporar TS-HA dentro de otros materiales de MEC además de la fascia, tal como dermis, submucosa del intestino delgado, pericardio, o incluso otros materiales de andamiaje derivados de biomateriales poliméricos (es decir, materiales derivados de animal). Además, los métodos anteriores se han desvelado principalmente a propósito de impregnar e incorporar macromoléculas de HA dentro de la MEC derivada. Las moléculas de HA se reticulan enlazando aductos de hidroxifenilo, preferentemente tiramina, unidos a aquellas moléculas para generar una red de HA conectada que es retenida en la matriz de MEC derivada. La matriz de MEC reticulada resultante, por consiguiente, difunde fuera de la matriz más lentamente, aumentando la duración de tiempo durante la consolidación cuando está presente para producir efectos beneficiosos. Se contempla que otras macromoléculas de policarboxilato o poliamina distintas de HA, que se prestan ellas mismas a la sustitución con aductos de hidroxifenilo, seguido de enlace mediante la química anteriormente descrita, puede incorporarse en un parche de MEC derivada, tal como un parche de fascia lata, mediante métodos análogos como se desvela para HA para producir efectos deseables o terapéuticos correspondientes asociados a aquellas otras macromoléculas. Macromoléculas de policarboxilato o poliamina alternativas (distintas de HA) que pueden impregnarse dentro de una matriz de MEC derivada y luego reticularse mediante enlace de aductos de hidroxifenilo encima pueden incluir moléculas de o basadas en otros glucosaminoglicanos (tales como heparina) y proteínas (tales como colágenos). Tales otras macromoléculas de policarboxilato o poliamina, que proporcionan o pueden proporcionar efectos deseables asociados, pueden incorporarse en la matriz de MEC derivada mediante métodos similares desvelados para HA en el presente documento y en las publicaciones incorporadas. En otra alternativa, las macromoléculas que ya poseen grupos laterales hidroxifenilo nativos pueden incorporarse en una matriz de MEC derivada y entonces reticularse para formar enlaces dihidroxifenilo entre grupos laterales hidroxifenilo nativos. En este caso, la etapa de sustituir grupos que contienen hidroxifenilo sobre la macromolécula puede omitirse, debido a que tales grupos ya están presentes.

En resumen, en un amplio aspecto se desvela una matriz de MEC derivada que incorpora una red macromolecular reticulada conectada dentro de la MEC derivada, red que incluye macromoléculas de policarboxilato o de poliamina que han sido sustituidas con aductos de hidroxifenilo y reticuladas mediante enlaces dihidroxifenilo. En un aspecto preferido, la matriz de MEC es fascia lata, preferentemente MEC de fascia lata humana, y las moléculas de policarboxilato o de poliamina sustituidas con hidroxifenilo son moléculas de HA sustituidas con tiramina que se han reticulado mediante enlaces ditiramina, para conectar una red de HA macromolecular dentro de la matriz de la fascia lata derivada. La matriz resultante se corta o se forma dentro de dimensiones adecuadas que van a usarse como parche, tanto para reforzar la reparación quirúrgica de un defecto o hueco de tejido, como para reparar el defecto como en el caso de un hueco que es demasiado amplio para la reparación basada en sutura convencional. Se contempla que es particularmente útil un parche compuesto de MEC derivada de la fascia lata que incorpora HA en forma de un red macromolecular que se reticula mediante enlaces ditiramina y así se conecta mecánicamente y se retiene dentro de la MEC en la reparación de desgarros del manguito de los rotadores, además de otras reparaciones de tendón al hueso o tejido conjuntivo.

Aspectos y características todavía adicionales de la invención serán evidentes de los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración y no limitación.

Ejemplo 1

Se obtuvo fascia lata humana acelularizada de la Musculoskeletal Transplant Foundation (Edison, NJ). Antes del transporte, la fascia se procesó según un procedimiento publicado, como se desvela en el documento WO/2006/101885, fecha de publicación de 28 de septiembre de 2006, con modificaciones, denominado después en el presente documento "pre-procesamiento estándar". Específicamente, el proceso modificado usado por la Musculoskeletal Transplant Foundation comprendía las siguientes etapas: (1) aislar fascia de un donante adecuado; (2) procesar la fascia que incluye inspección de defectos visuales, corte e impregnación del tejido en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y aclarado de la misma con PBS estéril; (3) impregnar el tejido en una composición de antibiótico y aclarar el mismo múltiples veces en PBS estéril; (4) procesar el tejido cortando el tejido a tamaño; y (5) congelar el tejido en PBS estéril a -20 °C y transporte sobre nieve carbónica.

- El HA se impregnó en fascia lata del siguiente modo. Se liofilizaron muestras de aproximadamente 4x4 cm de fascia lata durante al menos 24 horas. Tras la liofilización, las muestras individuales de la fascia se rehidrataron en una solución al 0,75 % (peso/volumen) de TS-HA (correspondiente a un porcentaje en masa-volumen, de forma que la solución incluye 0,75 g de TS-HA por 100 ml) (~1,5 ml/cm²) durante 24 horas a 37 °C en un agitador. El peso molecular de TS-HA usado fue 900 kDa - 1 MDa. La tasa de sustitución de tiramina fue ~5 %. Después de la impregnación de la fascia con TS-HA, la fascia se aclaró del TS-HA en exceso con agua de alta pureza durante ~30 segundos y se secó dos veces por lavado. Para reticular el TS-HA, la fascia se sumergió en una solución al 0,3 % de peróxido de hidrógeno durante ~30 segundos y se incubó durante la noche a 4 °C para permitir que la reacción continuara. Posteriormente, la fascia se aclaró del exceso de peróxido de hidrógeno con agua de alta pureza durante ~30 segundos y se liofilizó. Las muestras no reticuladas se sumergieron en agua de alta pureza durante ~30 segundos, se incubaron durante la noche a 4 °C, se aclararon y se liofilizaron. Los controles de agua se trataron por incubación en agua de alta pureza durante 24 horas a 37 °C en un agitador, se sometieron a peróxido de hidrógeno, y posteriormente se liofilizaron.
- Se usó electroforesis en hidratos de carbono asistida por fluoróforo (FACE) para cuantificar el contenido de HA de las muestras de fascia tratadas, según Calabro A. et al., *Microanalysis of enzyme digests of hyaluronan and chondroitin/dermatan sulfate by fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE)*, *Glycobiology* 2000, 10(3), pp. 273-81; y Calabro A., *Adaptation of FACE methodology for microanalysis of total hyaluronan and chondroitin sulfate composition from cartilage*, *Glycobiology* 2000, 10(3): 283-293. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1.

Análisis de electroforesis en hidratos de carbono asistida por fluoróforo (FACE) del contenido de HA en fascia de 4x4 cm tratada por difusión (PRE-PROCESAMIENTO ESTÁNDAR).			
Grupo de tratamiento	Contenido de TS-HA promedio (µg/mg)	Intervalo (µg/mg)	Tamaño de la muestra
Tratado con agua	0,07 ± 0,04	0,10-0,04	2 injertos, cada uno representado por el promedio de 4 submuestras
0,75 % con reticulación	14,2 ± 6,8	4,4-26,9	8 injertos, cada uno representado por el promedio de 2-5 submuestras
0,75 % sin reticulación	14,6 ± 3,2	10,14-18,4	6 injertos, cada uno representado por el promedio de 2-3 submuestras

- Según un enfoque alternativo, se pre-procesó fascia lata según el método de la publicación WO/2006/101885 (es decir, pre-procesamiento estándar), excepto que las muestras de fascia lata tuvieron 1x1 cm. Los tratamientos de difusión de la fascia lata se evaluaron basándose en soluciones de TS-HA que fueron 0,5, 0,75, o 1 % (peso/volumen). Se usó FACE para cuantificar el contenido de HA de las muestras de fascia tratadas, según las publicaciones de Calabro anteriormente mencionadas. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

TABLA 2.

Análisis de electroforesis en hidratos de carbono asistida por fluoróforo (FACE) del contenido de HA en fascia de 1x1 cm tratada por difusión (PRE-PROCESAMIENTO ESTÁNDAR).			
Grupo de tratamiento	Contenido de TS-HA promedio (µg/mg)	Intervalo (µg/mg)	Tamaño de la muestra
0,5 % con reticulación	2,5 ± 1,4	0,6-5,1	15
0,75 % con reticulación	6,9 ± 3,0	2,2-10,8	11
1 % con reticulación	12,1 ± 4,1	8,3-17,3	5

- Según otro enfoque alternativo, se preprocesó fascia lata según el método de la publicación WO/2006/101885, con modificaciones. Específicamente, se preparó fascia lata en masa y se transportó (denominado después en el presente documento "pre-procesamiento en masa"). La fascia en masa es fascia que se procesa según el documento WO/2006/101885, excepto que el tejido se somete a solo 4 horas de impregnación en antibiótico en vez de las 24 horas completas. Tras la recepción de la fascia lata en masa transportada, el proceso de impregnación en antibiótico continuó internamente sometiendo la fascia a una impregnación adicional de 20 horas antes de la congelación y liofilización. Adicionalmente, la fascia en masa se limpió internamente del exceso de tejido conjuntivo suelto y grasa. La fascia lata en masa (~4x4 cm) se trató entonces usando 0,75 % (peso/volumen) de solución de TS-HA. Se usó FACE para cuantificar el contenido de HA de las muestras de fascia tratadas, según las publicaciones de Calabro anteriormente mencionadas. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

TABLA 3.

Análisis de electroforesis en hidratos de carbono asistida por fluoróforo (FACE) del contenido de HA en fascia de 4x4 cm tratada por difusión (PRE-PROCESAMIENTO EN MASA).			
Grupo de tratamiento	Contenido de TS-HA promedio ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Intervalo ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Tamaño de la muestra
0,75 % con reticulación	10,4	7,6-13,2	2 injertos, cada uno representado por el promedio de 6 submuestras

Según otro enfoque alternativo, se preprocesó fascia lata según el método de la publicación WO/2006/101885, con modificaciones. Específicamente, se trató fascia lata en masa que no se sometió a liofilización antes de la impregnación en TS-HA (denominado después en el presente documento “en masa, no liofilizada, pre-procesamiento”). En su lugar, la fascia se mantuvo hidratada en PBS a 4 °C hasta que se sometió a tratamiento con TS-HA. La fascia (~4x4 cm) se trató usando 0,75 % (peso/volumen) y 2 % (peso/volumen) de soluciones de TS-HA. Se usó FACE para cuantificar el contenido de HA de las muestras de fascia tratadas, según las publicaciones de Calabro anteriormente mencionadas. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

TABLA 4.

Análisis de electroforesis en hidratos de carbono asistida por fluoróforo (FACE) del contenido de HA en fascia de 4x4 cm tratada por difusión (EN MASA, NO LIOFILIZADA, PRE-PROCESAMIENTO).			
Grupo de tratamiento	Contenido de TS-HA promedio ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Intervalo ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Tamaño de la muestra
0,75 % con reticulación	2,0	NA	1 injerto, cada uno representado por el promedio de 12 submuestras
2 % con reticulación	4,9	NA	1 injerto, cada uno representado por el promedio de 6 submuestras

En un método de análisis adicional, muestras de fascia tratadas con TS-HA (1x1 cm, difusión, pre-procesamiento estándar) se rehidrataron en 0,2 ml de solución salina durante 5 minutos y se incorporaron en el compuesto Tissue-Tek(R) OCT. Se cortaron y tiñeron secciones congeladas longitudinales de cinco micrómetros con proteína de unión a HA biotinilada (HABP, Calbiochem, San Diego, CA) y estreptavidina conjugada con Alexa Fluor(R) 488 (Molecular Probes, Carlsbad, CA) para visualizar la distribución de TS-HA en el tejido. La tinción con HABP demostró la incorporación de TS-HA a través de la profundidad del tejido, principalmente alrededor de los haces de fascículos grandes (FIG. 5). La flecha en la FIG. 5B indica la tinción de TS-HA. Se desea que el HA añadido se distribuya a través de la fascia, en vez de estratificarse a una alta concentración sobre la superficie, para promover beneficios más uniformes de la incorporación de HA, tales como la supresión de una respuesta inflamatoria. Además, la unión de HABP demuestra que TS-HA sigue biológicamente activo después de la reticulación.

Ejemplo 2

Un método para la impregnación de fascia lata con HA basado en vacío es el siguiente. Fascia lata, pre-procesada según tanto los métodos estándar como en masa, como se describe en el Ejemplo 1 anteriormente, se liofilizó durante al menos 24 horas. Tras la liofilización, la fascia se cortó dentro de muestras de 3 cm de diámetro y se rehidrató en agua de alta pureza durante ~10 minutos. Entonces se montaron muestras individuales de fascia lata sobre la plataforma de un sistema de filtración modificado Millipore Steriflip®. El recipiente superior se llenó con ~10 ml de solución de TS-HA y se aseguró al sistema de filtración. Se aplicó vacío y la solución de TS-HA se empujó a través de la fascia lata. Esto se repitió para aumentar el número de pases de solución a través de la fascia lata. Las concentraciones evaluadas fueron del 0,5, 0,75, 1 % (peso/volumen), y concentraciones crecientes. Se usó FACE para cuantificar el contenido de HA de las muestras de fascia tratadas, según las publicaciones de Calabro anteriormente mencionadas. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

TABLA 5.

Análisis de electroforesis en hidratos de carbono asistida por fluoróforo (FACE) de contenido de HA en fascia de 3 cm de diámetro tratada a vacío.				
Grupo de tratamiento	Pre-procesamiento de la fascia	Contenido de TS-HA promedio ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Intervalo ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Tamaño de la muestra
0,5 %, 8 pases, con reticulación	En masa	1,9 \pm 0,5	1,4-2,3	3 injertos, cada uno representado por el promedio de 2 submuestras
0,75 %, 1 pase, con reticulación	En masa	3,0 \pm 1,0	1,8-4,5	6
1 %, 2 pases, con reticulación	En masa	12,6 \pm 5,1	6,7-16	3
1 %, 8 pases, con reticulación	En masa	16,0 \pm 8,4	7,4-24,2	3

Análisis de electroforesis en hidratos de carbono asistida por fluoróforo (FACE) de contenido de HA en fascia de 3 cm de diámetro tratada a vacío.				
Grupo de tratamiento	Pre-procesamiento de la fascia	Contenido de TS-HA promedio ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Intervalo ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Tamaño de la muestra
Concentraciones crecientes, 2 pases por concentración, con reticulación	Estándar	$1,4 \pm 0,8$	0,7-2,3	3 injertos, cada uno representado por el promedio de 2 submuestras

Ejemplo 3

Un método para la impregnación de fascia lata con HA basado en centrifugación es el siguiente. Se recibió fascia lata, pre-procesada según el método convencional como se describe en el Ejemplo 1 anterior, liofilizada, se cortó en muestras de 1 cm de diámetro, y se rehidrató en agua de alta pureza durante ~10 minutos. Se colocaron muestras individuales de la fascia dentro de un dispositivo de filtro centrífugo correspondiente a un tubo Centricon® de Millipore y se cubrieron con 1,5 ml de solución de HA (para este ejemplo, no TS-HA). El tubo Centricon se centrifugó entonces a 5000 g durante ~1 hora. El "filtrado" de la solución se dispuso de nuevo dentro del tubo Centricon y la centrifugación se repitió una vez más. La concentración evaluada fue concentraciones crecientes (0,05→0,1→0,2→0,5 % (peso/volumen)). Para visualizar la distribución de HA en muestras de la fascia, las muestras se rehidrataron en 0,2 ml de solución salina durante 5 minutos y se incorporaron en el compuesto Tissue-Tek® OCT. Se cortaron secciones congeladas longitudinales de cinco micrómetros y se tiñeron con proteína de unión a HA biotinilada (HABP, Calbiochem, San Diego, CA) y estreptavidina conjugada con Alexa Fluor(R) 488 (Molecular Probes, Carlsbad, CA). La tinción con HABP demostró la incorporación de HA a través de toda la profundidad del tejido, similar a la FIG. 5.

Ejemplo 4

Se realizó un experimento para evaluar la respuesta del huésped a MEC de fascia enriquecida en TS-HA en un modelo de pared abdominal de la rata.

Diseño experimental. Se cortó una fascia lata humana celularizada en muestras de 1x1 cm y se distribuyó dentro de tres grupos de tratamiento: TS-HA con reticulación, HA sin reticulación, o controles no tratados. Las muestras se trataron de una manera similar a como se describe en el Ejemplo 1. En la cirugía, los injertos de la fascia se rehidrataron y se implantaron dentro de un defecto de espesor parcial de una vaina anterior de 6 ratas, n=2 por grupo, como se describe en la siguiente sección. Se proporcionan detalles adicionales en la siguiente referencia: Valentin JE et al., Extracellular matrix bioscaffolds for orthopaedic applications. A comparative histologic study. J. Bone Joint Surg. [Am.] 2006;88(12):2673-86. A las cuatro semanas, las ratas se sacrificaron y el injerto y músculo de alrededor se recogieron por histología. La densidad celular dentro del injerto se cuantificó usando técnicas de procesamiento de imágenes detalladas más adelante. La inflamación se evaluó cualitativamente por un patólogo certificado por el colegio.

Modelo de defectos de la pared abdominal de rata. Se usaron ratas Lewis macho adultas (450-600 g). Las ratas se anestesiaron y se prepararon para cirugía estéril. Mediante una incisión de la línea media ventral, se creó un defecto de 1x1 cm de espesor parcial en la vaina anterior adyacente a la línea alba. Se eliminó la vaina anterior y el músculo recto subyacente, la fascia transversal y el peritoneo se dejaron intactos. Se rehidrató un parche de MEC de fascia de 1x1 cm en solución salina durante diez minutos y a continuación se aseguró dentro del defecto usando cuatro suturas de esquina de 5-0 Prolene. El asegurar la fascia teóricamente permitió que el parche de MEC se sometiera a las fuerzas mecánicas suministradas por la musculatura de la pared abdominal nativa adyacente. Se cerró la incisión de la piel y se dejó que los animales se recuperaran de la anestesia bajo una lámpara calefactora antes de devolverse a las jaulas individuales durante la duración del estudio.

Procesamiento y análisis histológico. En la eutanasia, se recogieron el injerto de la fascia y el músculo de alrededor, se fijaron en 4 % de paraformaldehído y se procesaron rutinariamente para incorporación en parafina. Se cortaron secciones longitudinales de cinco micrómetros de espesor de cada muestra y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E). Las imágenes de RGB de las secciones de H&E se adquirieron usando una cámara digital Retiga 2000R CCD (1600x1200 píxeles, Q-Imaging, Burnaby, B.C., Canadá) unida a un microscopio vertical Leica DM 4000 (Heidelberg, Alemania) provisto de un objetivo 10X. La adquisición de imágenes fue completamente automatizada usando una platina motorizada en X, Y, Z (Prior Scientific, Rockland, MA) dirigida por el controlador por Objective Imaging's Oasis 4i (Kansasville, MI) y el software Imagen-Pro 6.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Las imágenes se capturaron de la longitud entera y la anchura de cada muestra y se tejieron dentro de un único montaje. Se usó Imagen-Pro para contar los núcleos teñidos con hematoxilina y determinar el área de tejido respectiva sobre tres secciones por rata. La inflamación se evaluó cualitativamente por un patólogo certificado por el colegio sobre una sección por rata.

Resultados: Número de células en MEC de fascia. A las cuatro semanas, el aspecto histológico de la fascia en todos los grupos presentó característicamente una periferia altamente celular y menos células en la porción central del

injerto (FIG. 6). Se indican el injerto de fascia y las capas de músculo subyacente (FIG. 6). Estuvo presente aumento de celularidad dentro de la fascia en los grupos tratados con HA (FIG. 6B-C) en comparación con la fascia sin tratar (FIG. 6A). Se contaron las células de una región de interés manualmente seleccionada sobre las imágenes montadas que incluyeron el injerto de fascia entero (~4 mm²). Las densidades celulares se muestran en la Tabla 6. Debido al pequeño tamaño de la muestra en este estudio, se usaron las seis medidas de las dos ratas para cada grupo para las comparaciones estadísticas preliminares usando análisis de la varianza. A las cuatro semanas, la densidad celular dentro de injertos tratados con TS-HA (2859 ± 295 células/mm²) fue significativamente superior a la de injertos no tratados (2102 ± 545 células/mm²) (p=0,02). La densidad celular dentro de injertos tratados con HA no reticulado (2724 ± 662 células/mm²) puede también demostrar que es diferente de los injertos no tratados (p=0,06) cuando se evalúa en un tamaño mayor de la muestra.

TABLA 6.

Densidad celular dentro de los injertos de fascia después de 4 semanas desde la implantación en un modelo de pared abdominal de la rata.

Grupo de tratamiento	Número de rata	Sección N.º 1 células/mm ²	Sección N.º 2 células/mm ²	Sección N.º 3 células/mm ²	Promedio por rata	DE por rata	Promedio por grupo (n=2 ratas)
Control de agua	1	2324	1537	1972	1944	394	2102
	2	2998	2213	1568	2260	716	
TS-HA con reticulación	3	3255	2959	3109	3108	148	2859
	4	2664	2492	2677	2611	103	
TS-HA sin reticulación	5	3752	2887	3155	3265	443	2724
	6	2089	2111	2350	2183	145	

Resultados: Inflamación crónica en MEC de fascia. Portaobjetos de cada una de las seis ratas se cegaron y se clasificaron en dos ocasiones separadas por un periodo de dos meses por un patólogo certificado por el colegio. Los portaobjetos se clasificaron para "inflamación crónica" en y alrededor del injerto, como se define principalmente por la presencia de linfocitos y células plasmáticas. Las clasificaciones se muestran en la Tabla 7. Hubo variabilidad en el grado de inflamación observado en el grupo de tratamiento con HA sin reticulación. Basándose en estas clasificaciones se sugiere que el tratamiento con TS-HA más reticulación está asociado a la menor inflamación crónica de los tres grupos. Sin embargo, debe observarse que la evaluación se limitó por una incapacidad para distinguir con certeza linfocitos de macrófagos. Obsérvese que se consideró que la Rata 5 tenía el grado de inflamación más alto (TABLA 7) y el mayor número de células (TABLA 6), mientras que la Rata 4 tuvo la menor inflamación, pero todavía un alto número de células. Este resultado sugiere que los tipos de células que constituyen los recuentos totales de células en cada grupo podrían ser diferentes y probablemente reflejar un intento por el patólogo para distinguir inflamación crónica (linfocitos y células plasmáticas) de macrófagos y células del estroma en las clasificaciones.

TABLA 7.

Clasificación de inflamación crónica. Los portaobjetos se clasificaron para linfocitos y células plasmáticas en y alrededor del injerto de la fascia; las clasificaciones se repitieron dos veces, 1= máximo, 6=mínimo.		
Grupo de tratamiento	Número de rata	Clasificación de inflamación (2 repeticiones)
Control de agua	1	2, 2
	2	3, 4
TS-HA con reticulación	3	4, 3
	4	6, 6
HA sin reticulación	5	1, 1
	6	5, 5

Discusión. Estos datos son importantes debido a que demuestran el uso del modelo de pared abdominal de la rata para evaluar la respuesta del huésped a andamiajes de MEC de fascia. Además, estos datos sugieren que el tratamiento con HA aumentará el número total de células en MEC de fascia en comparación con fascia sin tratar. Estos datos también proporcionan la base para la hipótesis de que la fascia enriquecida con TS-HA más reticulación se asociará a menos linfocitos y células plasmáticas, pero a número similar de macrófagos y células gigantes en comparación con fascia enriquecida con TS-HA sin reticulación o fascia tratada con agua. Finalmente, estos datos demuestran la necesidad de identificación positiva de tipos de células con el fin de interpretar definitivamente el efecto del tratamiento con HA sobre la respuesta del huésped.

Ejemplo 5

Se realizó un experimento para evaluar la liberación *in vitro* de TS-HA de MEC de fascia enriquecida con TS-HA.

5 Diseño experimental. Se trató fascia lata humana pre-procesada estándar (4x4 cm) con TS-HA con o sin reticulación usando los métodos de difusión descritos en el Ejemplo 1 (n=2 por grupo experimental). A partir de cada injerto, se cortó una muestra de 0,8x1 cm. Las muestras de fascia se rehidrataron en 1,2 ml de PBS y se incubaron durante 72 horas a 37 °C en un agitador. Después de las 72 horas, se liofilizaron trozos de la fascia y el contenido de TS-HA se midió con FACE. El contenido de TS-HA inicial de las muestras incubadas se estimó a partir del promedio de varios trozos pequeños mostrados sobre el injerto de 4x4 cm entero que no se incubaron, usando FACE según las publicaciones de Calabro anteriormente mencionadas.

10 Resultados: Liberación *in vitro* de TS-HA de fascia tratada con TS-HA. El porcentaje promedio de liberación de TS-HA después de 72 horas en PBS de fascia tratada con TS-HA con reticulación fue del 73 % (n=2, con resultados de 70,1 % y 76,6 % de liberación). El porcentaje promedio de liberación de TS-HA después de 72 horas en PBS de fascia tratada con TS-HA sin reticulación fue del 81 % (n=2 con, resultados del 82,8 % y 78,5 % de liberación).

15 Discusión. Estos datos sugieren que la reticulación ralentizará la liberación de TS-HA de MEC de fascia en comparación con sin reticulación. Experimentos adicionales y un mayor tamaño de la muestra son deseables para determinar si tiempo de reticulación más largo (sumergimiento en solución de peróxido con HRP) atraparán adicionalmente las moléculas de TS-HA en la MEC de fascia y ralentizará su liberación a un grado incluso mayor.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende matriz extracelular derivada de ser humano o animal que tiene incorporada en su interior una red macromolecular que comprende macromoléculas de policarboxilato, poliamina o polihidroxifenilo que se han reticulado mediante enlaces dihidroxifenilo, estando dicha red macromolecular conectada dentro de dicha matriz extracelular derivada.
- 10 2. La composición de la reivindicación 1, estando dicha matriz extracelular derivada del grupo que consiste en fascia lata, dermis, submucosa del intestino delgado y pericardio.
- 15 3. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, comprendiendo dichas macromoléculas macromoléculas de hialuronano.
- 20 4. La composición de la reivindicación 3, teniendo dichas macromoléculas de hialuronano aductos de tiramina sustituidos en ellas, comprendiendo dichos enlaces dihidroxifenilo enlaces ditiramina.
- 25 5. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 2-4, que comprende 1-2 por ciento en peso de macromoléculas de hialuronano basado en el peso de dicha fascia lata.
- 30 6. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 3-5, teniendo dichas macromoléculas de hialuronano un peso molecular promedio de 900 KDa o mayor.
- 35 7. Un método de preparación de una composición implantable, que comprende:
- 40 a) impregnar la matriz extracelular derivada de ser humano o animal con macromoléculas de hialuronano que tienen grupos laterales hidroxifenilo sustituidos en ellas; y
b) a partir de aquí hacer reaccionar dichos grupos laterales hidroxifenilo para formar enlaces dihidroxifenilo, incorporando así una red macromolecular reticulada de hialuronano que se conecta dentro de dicha matriz extracelular derivada.
- 45 8. El método de la reivindicación 7, estando dicha matriz extracelular derivada seleccionada del grupo que consiste en fascia lata, dermis, submucosa del intestino delgado y pericardio.
- 50 9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 7-8, comprendiendo dichos grupos laterales hidroxifenilo grupos laterales de tiramina, comprendiendo dichos enlaces dihidroxifenilo enlaces ditiramina.
- 55 10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 7-9, comprendiendo dicha matriz extracelular derivada fascia lata, estando dicha fascia lata impregnada por dichas macromoléculas de hialuronano a una tasa de carga de 1-2 por ciento en peso basado en el peso de dicha fascia lata.
11. Un parche que comprende la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para su uso para reforzar una reparación de tejido, o para reparar un defecto o hueco de tejido.
12. El parche de la reivindicación 11, comprendiendo dicha matriz extracelular derivada fascia lata, comprendiendo dichas macromoléculas macromoléculas de hialuronano.
13. El parche de la reivindicación 11, dichos enlaces dihidroxifenilo se obtienen reticulando grupos tiramina que están sustituidos sobre dichas macromoléculas de hialuronano a una tasa de sustitución de aproximadamente o inferior al 5 % basado en sitios de sustitución disponibles.
14. El parche de la reivindicación 11, en el que el uso comprende la aplicación del parche sobre un defecto suturado o hueco para reforzarlo.
15. El parche de la reivindicación 11, en el que el uso comprende disponer un gel de colágeno entre dicho parche y tejidos huésped que rodean dicho defecto o hueco de tejido, siendo dicho gel de colágeno proporcionado como colágeno sustituido con tiramina reticulado.

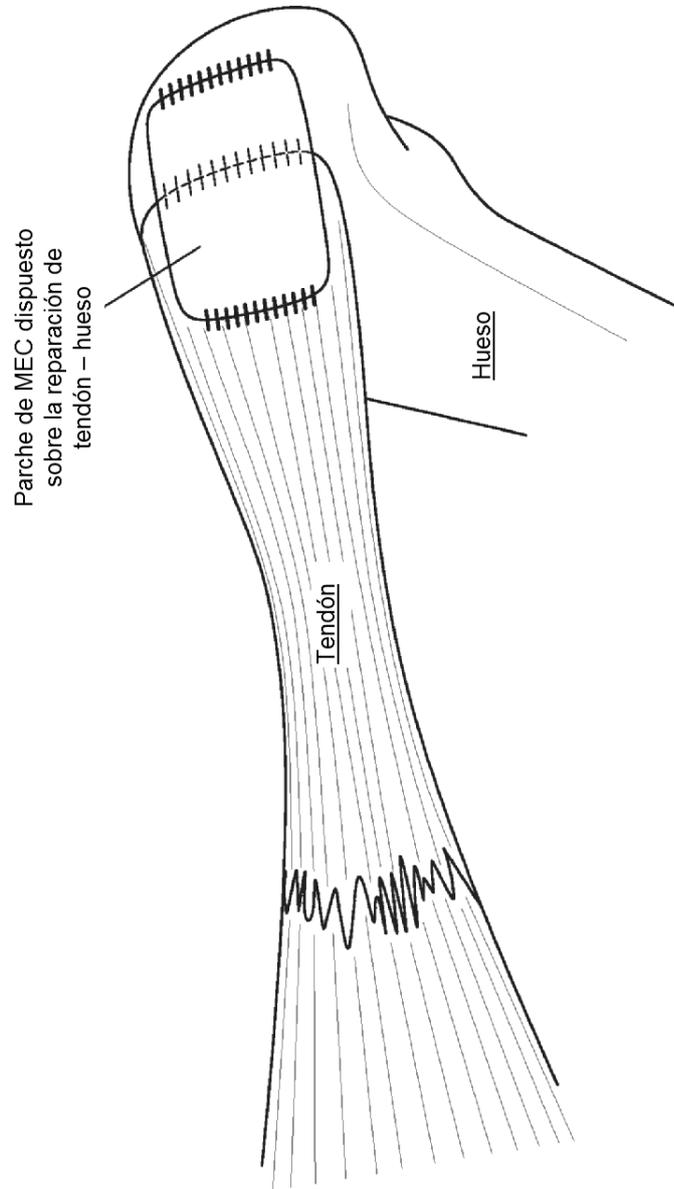


FIG.1

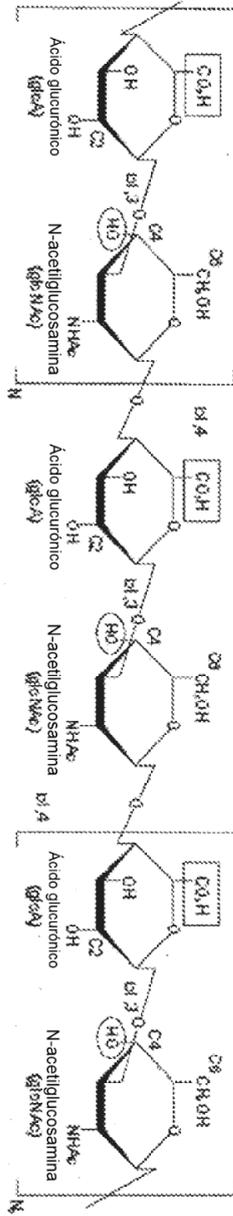


FIG. 2

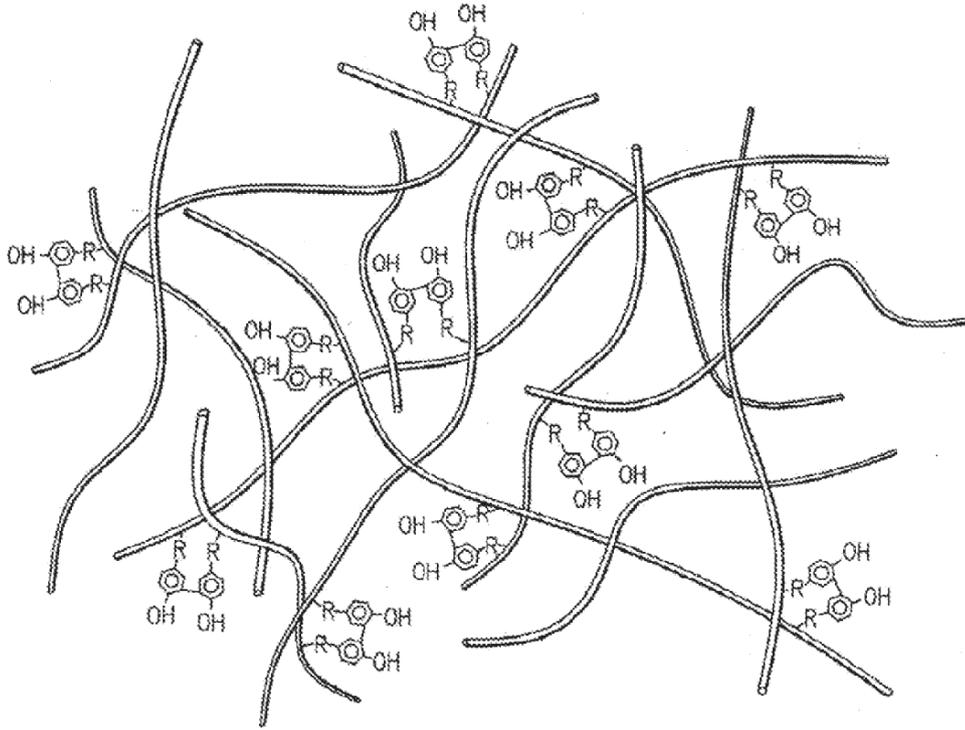


FIG. 3

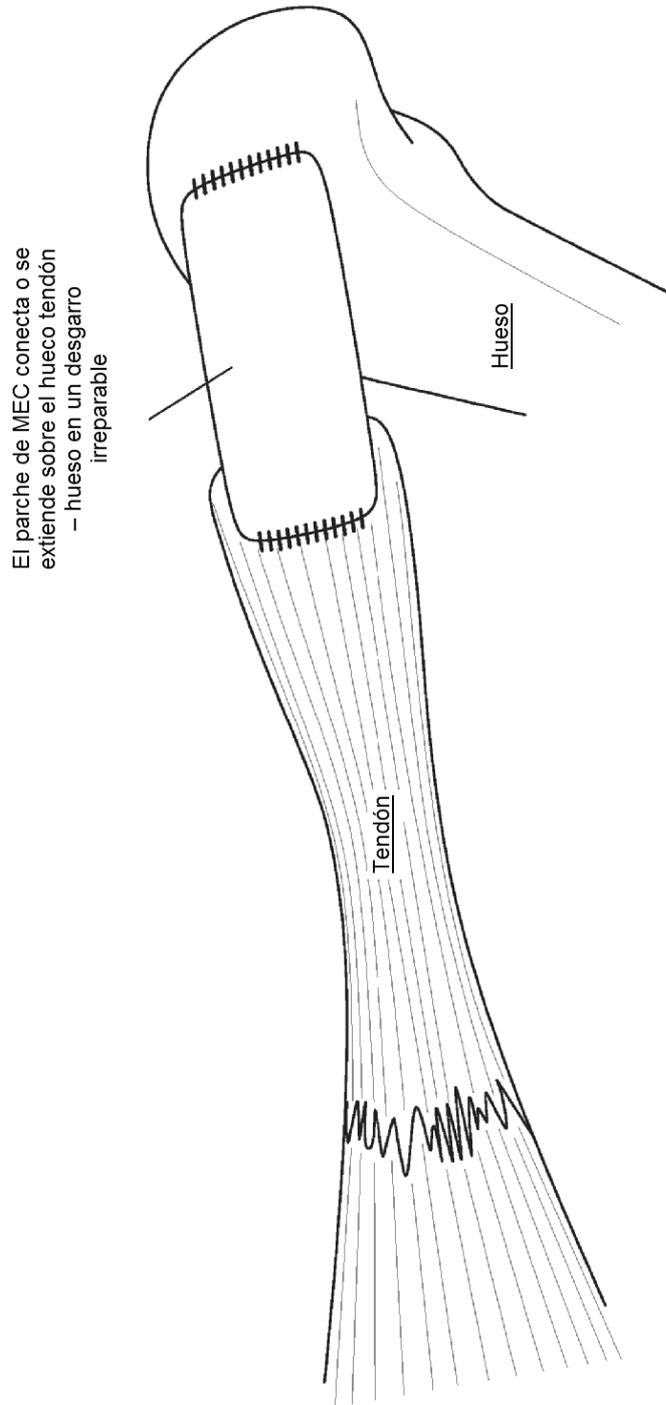


FIG. 4

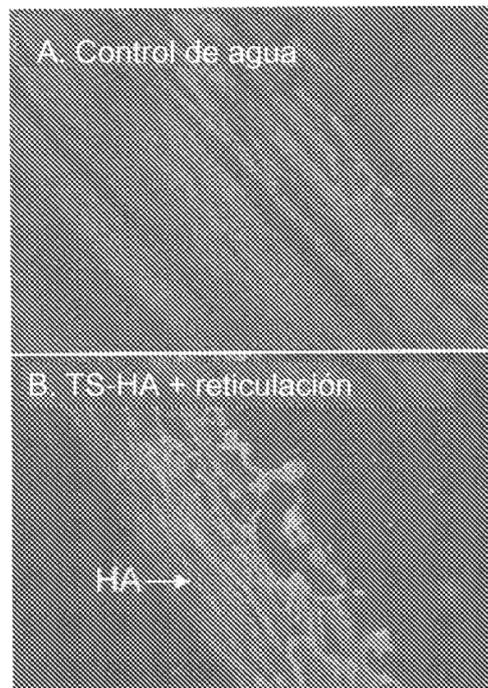


FIG. 5

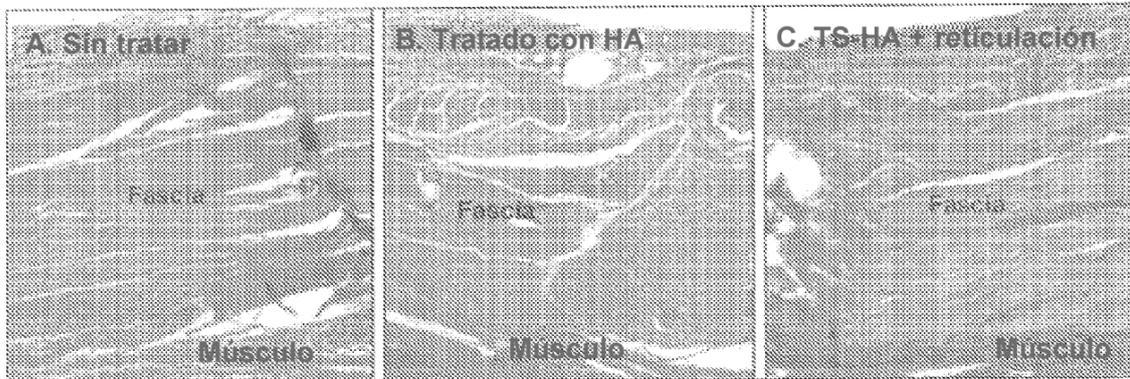


FIG. 6