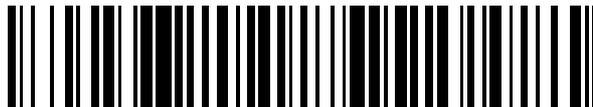


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 100**

51 Int. Cl.:

A61K 35/34 (2015.01)

A61K 35/28 (2015.01)

A61P 9/06 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.09.2009 PCT/US2009/059015**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.04.2010 WO10039823**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2009 E 09818438 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2017 EP 2349292**

54 Título: **Composiciones que comprenden matriz extracelular descelularizada obtenida a partir de tejido cardíaco**

30 Prioridad:

30.09.2008 US 101332 P

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

01.08.2017

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)
1111 Franklin Street, 5th Floor
Oakland, CA 94607, US**

72 Inventor/es:

**CHRISTMAN, KAREN;
SINGELYN, JENNIFER y
DEQUACH, JESSICA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU SLP, .

Observaciones:

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

ES 2 628 100 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 que comprenden matriz extracelular descelularizada obtenida a partir de tejido cardíaco

Referencias a solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica prioridad a la solicitud provisional de EE.UU. No. 61/101.332, presentada el 30 de septiembre de 2008.

Declaración de interés gubernamental

Esta invención se realizó con apoyo gubernamental bajo la subvención No. OD004309 otorgada por los National Institutes of Health (Institutos Nacionales de la Salud) (NIH). El gobierno tiene algunos derechos en la invención.

Antecedentes

10 Diversas publicaciones, que incluyen patentes, solicitudes publicadas, artículos técnicos y artículos académicos se citan a lo largo de la memoria descriptiva.

15 La enfermedad cardiovascular es la principal causa de muerte en los Estados Unidos. La causa más común de enfermedad cardiovascular es el infarto de miocardio (MI), que ocurre cuando una arteria coronaria se ocluye. El MI da como resultado la muerte de los cardiomiocitos y la degradación de la matriz extracelular (ECM), seguido por el depósito de tejido cicatricial. Finalmente se inicia la insuficiencia cardíaca, y el corazón se dilata, lo que conduce a la disminución de la eficacia de bombeo. Como hay muy pocos progenitores cardíacos en el corazón y estos progenitores no se dividen fácilmente, la regeneración del tejido cardíaco no se produce de forma natural. Los tratamientos actuales para la insuficiencia cardíaca dependen en gran medida de procedimientos quirúrgicos invasivos y hacen poco para reparar el tejido cardíaco dañado.

20 Los procedimientos investigados más recientemente utilizan la inyección de células sanas en la pared del infarto del ventrículo izquierdo (LV) en un intento de regenerar el miocardio, aunque los estudios han demostrado una mala supervivencia de las células inyectadas. Células que incluyen células madre adultas y embrionarias, células madre pluripotentes inducidas, y células diferenciadas tales como cardiomiocitos se han cultivado típicamente sobre superficies o armazones revestidos con una o varias proteínas de matriz extracelular. Sin embargo, *in vivo*, estas células existen en un medio extracelular altamente complejo.

25 Algunos materiales obtenidos de forma natural están siendo investigados actualmente para inyección en el miocardio, que incluyen fibrina, colágeno, alginato, matrigel, y gelatina. Ninguno de éstos proporciona una cantidad significativa de los componentes nativos de la matriz extracelular cardíaca. Para el tratamiento de la arritmia, las formas no ablativas actuales incluyen inyección de fibrina y células. Las matrices existentes para el cultivo celular *in vitro* para cardiomiocitos, células madre, y otras células cardíacas relevantes incluyen colágeno, laminina, SURECOAT (CELLUTRON, mezcla de colágeno y laminina), y gelatina.

30 Los esfuerzos actuales para prevenir la insuficiencia cardíaca después del infarto de miocardio se han centrado en trasplante celular para reemplazar a los cardiomiocitos necróticos, prevenir la remodelación negativa del ventrículo izquierdo, y regenerar el tejido cardíaco. Sin embargo, sin la matriz adecuada, el crecimiento de cardiomiocitos *in vitro* y la supervivencia *in vivo* han sido deficientes. Existe una necesidad de composiciones mejoradas para la reparación cardíaca, el tratamiento de la arritmia y el cultivo de células cardíacas. De forma similar, también existe la necesidad de composiciones mejoradas para la reparación, regeneración y cultivo celular del músculo esquelético.

Compendio de la invención

40 En un aspecto, la invención proporciona una composición líquida que comprende una matriz extracelular descelularizada obtenida de tejido cardíaco, en donde la composición es adecuada para administrarse a través de un catéter de aguja sin obstruir el catéter, en donde la matriz extracelular descelularizada se puede obtener por un método que comprende:

45 (a) procesar una muestra de tejido cardíaco que tiene un componente de matriz extracelular y un componente de matriz no extracelular para separar el componente de matriz no extracelular para obtener una matriz extracelular descelularizada;

(b) liofilizar y pulverizar la matriz extracelular descelularizada en un polvo;

(c) producir una composición que comprende el polvo de matriz extracelular descelularizada en un líquido;

(d) digerir la matriz extracelular descelularizada en la composición de la etapa (c) con una enzima degradadora de la matriz a pH 1-6; y

50 (e) neutralizar el pH de la matriz extracelular descelularizada digerida de la etapa (d) para producir la composición líquida;

en donde la composición líquida se convierte en un gel a temperatura corporal. En algunos casos, el tejido cardíaco es tejido miocárdico y en otros casos el tejido es tejido pericárdico. La composición puede ser inyectable. La composición se puede formular para que esté en forma líquida a temperatura ambiente, normalmente 20°C a 25°C, y en forma de gel a una temperatura superior a la temperatura ambiente o superior a 35°C.

5 En algunos casos, dicho tejido cardíaco se selecciona del grupo que consiste en corazones humanos, corazones de primates, corazones porcinos, corazones de bovinos, u otros corazones cualesquiera de mamíferos o animales, que incluyen, pero no se limitan a, corazón de cabra, corazón de ratón, corazón de rata, corazón de conejo, y corazón de pollo.

10 En algunos casos, la composición es adecuada para inyección en la pared del infarto después de un infarto de miocardio. En algunos casos, la composición se configura adecuada para administración a través de una aguja de calibre pequeño (por ejemplo, calibre 27 o menor). En algunos casos, dicha composición es adecuada para la implantación en un paciente.

15 En algunos casos, la composición comprende quimiotaxis natural, factores de crecimiento y estimuladores que incorporan células a la composición. En algunos casos la composición comprende glicosaminoglicanos naturales. En algunos casos, la composición comprende además factores no naturales que incorporan células a la composición.

En algunos casos, la composición comprende además una población de células terapéuticas exógenas. Las células pueden ser células madre u otros precursores de cardiomiocitos u otras células relacionadas con el corazón.

20 En algunos casos, la composición comprende además un agente terapéutico, y como tal está configurada como un vehículo de administración de fármaco. En algunos casos, la composición está configurada como un bloque de conducción no destructiva para tratar, por ejemplo, las arritmias. En algunos casos, la composición está configurada para revestir superficies, tales como placas o armazones de cultivo de tejidos, para cultivar cardiomiocitos u otros tipos de células relevantes para la reparación cardíaca.

25 En un aspecto, la invención proporciona un método para producir una composición que comprende una matriz extracelular cardíaca descelularizada que comprende: (a) procesar una muestra de tejido cardíaco que tiene un componente de matriz extracelular y un componente de matriz no extracelular con dodecilsulfato sódico para separar el componente de matriz no extracelular para obtener la matriz extracelular cardíaca descelularizada, (b) liofilizar y pulverizar la matriz extracelular cardíaca descelularizada en un polvo; (c) producir una composición que comprende el polvo de matriz extracelular descelularizada en un líquido; (d) digerir la matriz extracelular cardíaca descelularizada de la etapa (c) con una enzima degradadora de la matriz a pH 1-6 y (e) neutralizar el pH de la matriz extracelular descelularizada digerida de la etapa (d).

30

35 En algunos casos, dicho método comprende además la etapa de preparar en suspensión y neutralizar dicha matriz extracelular cardíaca descelularizada en una disolución. En algunos casos, dicha disolución es una disolución tamponada con fosfato (PBS) o disolución salina que se puede inyectar a través de una aguja de alto calibre en el miocardio. Dicha composición se forma en un gel a temperatura corporal. En algunos casos, dicha composición comprende además células, fármacos, proteínas u otros agentes terapéuticos que se pueden administrar dentro o unidos a la composición antes, durante o después de la gelificación.

40 En algunos casos, dicha disolución se coloca en placas o pocillos de cultivo de tejidos, se incuba por encima de 35°C o aproximadamente 37°C para formar un gel que se usa para cultivo celular. En esta memoria se describe un método para cultivar células en una matriz adsorbida, que comprende las etapas de: proporcionar una disolución que comprende una matriz extracelular descelularizada obtenida de tejido cardíaco en un dispositivo de cultivo de tejidos; incubar dicho dispositivo de placas de cultivo de tejidos; separar dicha disolución; y cultivar células sobre la matriz adsorbida. En algunos casos, dichas células son cardiomiocitos u otros tipos de células relevantes para la reparación cardíaca.

45 En un aspecto, la invención proporciona una composición líquida para usar en terapia. Un método terapéutico para reparación de tejido cardíaco en un sujeto puede comprender inyectar o implantar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende matriz extracelular descelularizada obtenida de tejido cardíaco en un sujeto que lo necesite.

También se describen en esta memoria composiciones que comprenden matriz extracelular descelularizada obtenida de tejido muscular esquelético.

50 **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 ilustra un corazón ejemplar resultante del método de administrar una composición de la presente invención en la parte superior o una terapia estándar en la parte inferior.

La Figura 2 ilustra el área miofibrilar media de cardiomiocitos obtenidos de células madre embrionarias humanas cultivados en ECM cardíaca.

La Figura 3 ilustra el número promedio de núcleos de cardiomiocitos derivados de células madre embrionarias humanas por área miofibrilar cultivados en ECM cardíaca.

La Figura 4 muestra el tamaño medio de la placa desmosómica en ECM cardíaca.

La Figura 5 ilustra mioblastos esqueléticos cultivados sobre matriz del músculo esquelético.

5 La Figura 6 ilustra que los mioblastos esqueléticos migran específicamente hacia la matriz del músculo esquelético.

Descripción detallada de la invención

En algunas realizaciones preferidas, la presente invención proporciona una composición de matriz extracelular (ECM) cardíaca descelularizada que se puede usar, por ejemplo, para administrar agentes terapéuticos, incluidas células, en la pared del corazón después de un infarto de miocardio. La ECM de la presente invención puede obtenerse de la matriz nativa o natural del tejido de corazón de mamífero. En la presente memoria se describen composiciones que comprenden ECM cardíaca que se puede usar para inyección en tejido cardíaco que necesita tratamiento terapéutico. La ECM puede usarse también para incorporar células al tejido lesionado o como un vehículo de administración de fármacos. La composición se puede usar también para soportar el tejido lesionado o cambiar las propiedades mecánicas. Otro uso puede ser como un bloque de conducción no destructiva para tratar, por ejemplo, las arritmias. En algunos casos, la ECM de corazón o cardíaca como se describe en esta memoria se obtiene de tejido miocárdico. En otros casos, la ECM de corazón o cardíaca como se describe en la presente memoria se obtiene de tejido pericárdico.

Una composición que comprende ECM cardíaca descelularizada como se describe en la presente memoria puede ayudar a regenerar el miocardio defectuoso o ausente y restaurar la función cardíaca. La composición de la ECM puede obtenerse de una fuente animal o sintética. Una composición de matriz extracelular de la presente invención puede comprender además uno o más componentes adicionales, por ejemplo, sin limitación: una célula exógena, un péptido, polipéptido, o proteína, un vector que expresa un ADN de una molécula bioactiva, y otros agentes terapéuticos tales como fármacos, factores de crecimiento celular, nutrientes, antibióticos u otras moléculas bioactivas. Por tanto, en algunas realizaciones preferidas, la composición de ECM puede comprender además una población exógena de células tales como precursores de cardiomiocitos, como se describe más adelante.

En algunos casos, se describen métodos de administración en donde la composición puede ponerse en contacto con un miocardio defectuoso, enfermo o ausente, dando como resultado la regeneración del tejido miocárdico y la restauración de la contractilidad, conductividad, o función sana del músculo cardíaco. En algunos casos, la composición de la presente invención puede incorporar células endógenas en el receptor y puede coordinar la función de las células recién incorporadas o añadidas, permitiendo la proliferación o migración celular en la composición.

Los esfuerzos previos para prevenir la insuficiencia cardíaca después del infarto de miocardio (MI) se han centrado en el trasplante celular para reemplazar a los cardiomiocitos necróticos, prevenir la remodelación negativa del ventrículo izquierdo (LV), y regenerar el tejido cardíaco. Se ha explorado una variedad de tipos celulares como terapias de trasplante celular, que incluyen cardiomiocitos, mioblastos esqueléticos, células madre mesenquimales y embrionarias. Lamentablemente, sin la matriz apropiada la supervivencia celular *in vivo* ha sido deficiente. Algunas matrices derivadas de fuentes naturales que se han utilizado para intentar ayudar en la retención y supervivencia celular tras la inyección en la técnica anterior incluyen fibrina, colágeno, matrigel, alginato, y gelatina. Sin embargo, ninguno de estos materiales imita adecuadamente a los componentes naturales que se encuentran específicamente en la matriz extracelular cardíaca.

Los armazones inyectables actuales para tratar el corazón post-MI (post-infarto de miocardio) fallan en proporcionar todos los componentes deseados de la matriz extracelular que las células requieren para desarrollarse. Por tanto, la supervivencia celular en tales armazones ha sido limitada. En algunas realizaciones, esta invención proporciona un método de descelularización y gelificación de ECM cardíaca natural para crear un almacén *in situ* para trasplante celular. En esta memoria se ha proporcionado un protocolo apropiado de digestión y preparación que puede crear geles nanofibrosos. La disolución de gel es capaz de ser inyectada en el miocardio o infarto, demostrando así su potencial como un almacén de gelificación *in situ*. Dado que una ECM cardíaca descelularizada imita mejor el entorno cardíaco natural, mejora la supervivencia y la retención celular tras la inyección en el sitio del infarto de miocardio, estimulando así la regeneración del tejido miocárdico.

La Figura 1 ilustra un método ejemplar para administrar una composición de la presente invención. A la izquierda se muestra un corazón sano. Después del infarto de miocardio mostrado en el diagrama central, ninguna terapia estándar actual, tal como productos farmacéuticos disponibles y dispositivos médicos solamente, evita eficazmente la muerte de los cardiomiocitos, la remodelación negativa del LV, dilatación del LV, e insuficiencia cardíaca, como se muestra en el esquema inferior derecho. La presente invención mejora este problema facilitando la administración de una composición inyectable como se describe en la presente memoria. La administración de una composición de la presente invención a un LV proporciona una mejor regeneración, un tamaño reducido del infarto, una remodelación reducida del LV, y una función cardíaca mejorada, como se muestra en el diagrama esquemático superior derecho del corazón.

La invención presenta una matriz extracelular cardíaca descelularizada, así como métodos para la producción y uso de la misma. En particular, la invención se refiere a una composición biocompatible que comprende una matriz extracelular cardíaca descelularizada obtenida directamente de tejido cardíaco, y se puede usar para tratar tejidos u órganos defectuosos, enfermos, lesionados o isquémicos en un sujeto, preferiblemente un corazón humano, inyectando o implantando en el sujeto la composición biocompatible que comprende la matriz extracelular cardíaca descelularizada.

En algunos casos, la matriz extracelular cardíaca descelularizada se obtiene de tejido cardíaco natural seleccionado del grupo que consiste en corazones humanos, porcinos, bovinos, de cabra, de ratón, de rata, de conejo, de pollo o de cualquier otro mamífero o animal. La composición biocompatible que comprende la matriz extracelular cardíaca descelularizada está en forma de gel o disolución inyectable, y se puede usar para reparación cardíaca trasplantando o administrando células, contenidas en ella, a la pared del infarto después de un infarto de miocardio, o incorporando las propias células del paciente en el tejido cardíaco lesionado. En otros casos, el material biocompatible que comprende una ECM cardíaca descelularizada es, por ejemplo, un parche, una emulsión, un líquido viscoso, fragmentos, partículas, micropelotas, o nanopelotas.

La composición puede proporcionar materiales biocompatibles para cultivar cardiomiocitos u otras células cardíacas relevantes en laboratorios de investigación, o en un entorno clínico previo al trasplante y para reparación cardíaca. Los métodos pueden incluir también fabricar y revestir una superficie, como placas o pocillos de cultivo de tejidos, con matriz extracelular cardíaca descelularizada. Los materiales biocompatibles pueden ser adecuados para implantación en un paciente, ya sea humano o animal.

La invención proporciona además un método para producir un material biocompatible que comprende la matriz extracelular cardíaca descelularizada de la invención. Tal método comprende las etapas de: (a) procesar una muestra de tejido cardíaco que tiene un componente de matriz extracelular y un componente de matriz no extracelular con dodecilsulfato sódico para separar el componente de matriz no extracelular para obtener matriz extracelular cardíaca descelularizada; y (b) liofilizar y pulverizar la matriz extracelular descelularizada en un polvo; (c) producir una composición que comprende el polvo de matriz extracelular descelularizada en un líquido; (d) digerir la matriz extracelular descelularizada en la composición de la etapa (c) con una enzima degradadora de la matriz a pH 1-6; y (e) neutralizar el pH de la matriz extracelular descelularizada digerida de la etapa (d). La muestra de tejido cardíaco se puede aislar de un mamífero tal como un no primate (por ejemplo, vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, ratas, etc.) o un primate (por ejemplo, mono y humano), o una fuente aviar (por ejemplo, pollo, pato, etc.). Los procedimientos de descelularización para la muestra de tejido cardíaco se realizan usando una o más técnicas físicas, químicas y/o biológicas, conocidas en la técnica y como se enseñan en la presente memoria.

Para terapia humana, existen muchas fuentes potenciales para el material de matriz extracelular cardíaca: corazón humano (que incluye autólogo, alogénico, o cadavérico), corazón porcino, corazón bovino, corazón de cabra, corazón de ratón, corazón de rata, corazón de conejo, corazón de pollo, y otras fuentes animales. A diferencia del trasplante cardíaco total, se puede usar un corazón donante para tratar a muchas personas. Animales no humanos son una fuente de matriz extracelular de corazón sin necesidad de donantes humanos. Como reactivo de investigación, se pueden utilizar fuentes animales no humanas.

Un método de procesamiento de la matriz extracelular cardíaca es como sigue. El tejido cardíaco se descelulariza primero, dejando solo la matriz extracelular. La descelularización se puede realizar con una perfusión de dodecilsulfato sódico y disolución tamponada con fosfato, por ejemplo. La matriz extracelular cardíaca se liofiliza después, se tritura y se digiere con pepsina a un pH bajo, entre aproximadamente pH 1-6 o pH 1-4, u otras enzimas degradadoras de la matriz tales como metaloproteinasas de matriz.

Para producir una forma de gel de la matriz extracelular cardíaca para terapia *in vivo*, la disolución que comprende la matriz extracelular del corazón se neutraliza y se lleva a la temperatura, concentración y viscosidad deseadas usando PBS/disolución salina. En algunas realizaciones, la concentración de ECM puede ser 1-20 mg/mL, o 2-8 mg/mL. La disolución que comprende la matriz extracelular cardíaca puede entonces inyectarse a través de una aguja de alto calibre, tal como calibre 27 o superior, en el miocardio. A temperatura corporal, por ejemplo 36,8°C ± 0,7°C, tal disolución forma entonces un gel. Células, fármacos, proteínas, u otros agentes terapéuticos se pueden administrar también dentro del gel de ECM cardíaca.

Para producir una forma de gel de la matriz extracelular cardíaca para usos *in vitro*, la disolución que comprende la matriz extracelular del corazón se neutraliza y se lleva hasta la concentración deseada usando PBS/disolución salina. En algunas realizaciones, la concentración de ECM puede ser 1-20 mg/mL, o 2-8 mg/mL. Dicha disolución se puede colocar entonces sobre cualquier superficie sólida tal como en placas/pocillos de cultivo de tejidos. Una vez colocada en una incubadora a 37°C o por encima de la temperatura ambiente, la disolución forma un gel que se puede usar para cultivo celular.

Un método terapéutico para la reparación cardíaca en un sujeto puede comprender inyectar o implantar en parte o en su totalidad el material de ECM cardíaca biocompatible de la invención en un paciente. La invención puede proporcionar además un método terapéutico para tratar la arritmia u otro tejido u órgano defectuoso, enfermo,

dañado o isquémico en un sujeto, que comprende inyectar o implantar el material biocompatible de la invención *in situ*.

5 Las composiciones de la presente invención pueden comprender una ECM descelularizada obtenida de tejido cardíaco y otro componente o componentes. En algunos casos, la cantidad de ECM en la composición total es mayor que 90% ó 95% ó 99% de la composición en peso. En algunas realizaciones, la ECM en la composición total es superior a 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% u 80% de la composición en peso.

10 Se preparan matrices extracelulares descelularizadas de manera que se conserva gran parte de la bioactividad para la regeneración de tejido miocárdico. La bioactividad ejemplar de las composiciones de la presente invención incluye sin limitación: control o iniciación de la adherencia celular, migración celular, diferenciación celular, maduración celular, organización celular, proliferación celular, muerte celular (apoptosis), estimulación de la angiogénesis, actividad proteolítica, actividad enzimática, motilidad celular, modulación proteica y celular, activación de eventos de transcripción, provisión de eventos de traducción, inhibición de algunas bioactividades, por ejemplo inhibición de la coagulación, atracción de células madre, quimiotaxis, y MMP u otra actividad enzimática.

15 Las composiciones comprenden una matriz extracelular que está sustancialmente descelularizada. En algunos casos, una matriz descelularizada no comprende células nativas vivas con las que se produce la ECM naturalmente. En algunos casos, una matriz sustancialmente descelularizada comprende menos del 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% ó 10% de células nativas en peso.

20 Como se describe en la presente memoria, una composición puede comprender una ECM cardíaca descelularizada y EMC descelularizada de tejido diferente o un polímero sintético o de origen natural. Los polímeros ejemplares de la presente invención incluyen, pero no se limitan a: fibra de tereftalato de poli(etileno) (DRACON), poli(tetrafluoroetileno) (PTFE), pericardio reticulado con glutaraldehído, poli(lactato) (PLA), poliglicol (PGA), ácido hialurónico (HA), poli(etilenglicol) (PEG), poli(etileno), nitinol, y colágeno de fuentes animales y no animales (tales como plantas y colágenos sintéticos). En algunos casos, un polímero de la composición es biocompatible y biodegradable y/o bioabsorbible. Polímeros biodegradables o bioabsorbibles ejemplares incluyen, pero no se limitan a: polilactidas, poliglicólidos, poli(caprolactona), polidioxano y sus copolímeros aleatorios y de bloques. Un polímero biodegradable y/o bioabsorbible puede contener un monómero seleccionado del grupo que consiste en un glicólido, lactida, dioxanona, caprolactona, carbonato de trimetileno, etilenglicol y lisina.

30 El material polimérico puede ser un copolímero aleatorio, un copolímero de bloques o una mezcla de monómeros, homopolímeros, copolímeros, y/o heteropolímeros que contienen estos monómeros. Los polímeros biodegradables y/o bioabsorbibles pueden contener poliésteres alifáticos lineales bioabsorbibles y biodegradables tales como poli(glicolida) (PGA) y su copolímero aleatorio poli(glicolida-co-lactida) (PGA-co-PLA). Otros ejemplos de polímeros biocompatibles adecuados son metacrilatos de polihidroxialquilo incluyendo metacrilato de etilo, e hidrogeles tales como poli(vinilpirrolidona) y poli(acrilamidas). Otros materiales bioabsorbibles adecuados son biopolímeros que incluyen colágeno, gelatina, ácido algínico, quitina, quitosano, fibrina, ácido hialurónico, dextrano, poliaminoácidos, poli(lisina) y copolímeros de estos materiales. Cualquier combinación, copolímero, polímero o mezcla de los mismos de los ejemplos anteriores se considera para su uso según la presente invención. Tales materiales bioabsorbibles se pueden preparar por métodos conocidos.

40 Por tanto, en la presente memoria se describen métodos para preparar una composición que comprende ECM descelularizada obtenida de tejido del músculo cardíaco. También se proporcionan composiciones, dispositivos y métodos de producción y uso relacionados.

45 La viscosidad de la composición aumenta cuando se calienta por encima de la temperatura ambiente, incluyendo temperaturas fisiológicas cercanas a aproximadamente 37°C. Según un uso, la composición obtenida con ECM es una disolución inyectable a temperatura ambiente y otras temperaturas por debajo de 35°C. En otro uso no limitativo el gel se puede inyectar a una temperatura corporal por encima de aproximadamente 37°C o cerca de la temperatura corporal, pero se gelifica más rápidamente a temperaturas crecientes. Se forma un gel después de aproximadamente 15-20 minutos a una temperatura fisiológica de 37°C. Se proporciona una serie de principios generales para preparar un gel obtenido con ECM, junto con protocolos específicos preferidos para preparar geles de los siguientes Ejemplos que son aplicables y adaptables a numerosos tejidos que incluyen sin limitación músculo cardíaco y esquelético.

50 Las composiciones que pueden incluir células u otros agentes terapéuticos se pueden implantar en un paciente, humano o animal, mediante una serie de métodos. En algunos casos, las composiciones se inyectan como un líquido en un sitio deseado del paciente.

55 En los métodos, dispositivos y composiciones descritos en la presente memoria se pueden combinar también preparaciones de ECM comercialmente disponibles. Por ejemplo, se puede obtener ECM de la submucosa del intestino delgado (SIS). Las preparaciones comercialmente disponibles incluyen, pero no se limitan a, SURGISIS™, SURGISIS-ES™, STRATASIS™, y STRATASIS-ES™ (Cook Urological Inc.; Indianapolis, Ind.) y GRAFTPATCH™ (Organogenesis Inc.; Canton, Mass.). La ECM se obtiene de la dermis. Las preparaciones comercialmente disponibles incluyen, pero no se limitan a, PELVICOL™ (vendido como PERMACOL™ en Europa; Bard, Covington,

Ga.), REPLIFORM™ (Microvasive; Boston, Mass.) y ALLODERM™ (LifeCell; Branchburg, N.J.).

En algunos casos, la disolución, forma de gel, y forma adsorbida de la matriz extracelular cardíaca de la invención proporcionan todos los constituyentes en las proporciones similares a las encontradas *in vivo*. Para el tratamiento de la arritmia, se puede administrar la matriz extracelular de la invención que puede permitir la regeneración del tejido cardíaco después de la resolución de la arritmia. Para el cultivo celular *in vitro* para cardiomiocitos y otras células cardíacas relevantes, el gel y las formas adsorbidas de la matriz extracelular cardíaca de la invención contienen todas o muchas de las mismas señales de la matriz extracelular que las células reconocen *in vivo* en comparación con el colágeno de uso común, laminina, SURECOAT (CELLUTRON, mezcla de colágeno y laminina), y gelatina.

Las composiciones de la presente invención proporcionan una forma de gel o disolución de matriz extracelular de corazón, y el uso de estas formas de matriz extracelular de corazón puede incluir reparación cardíaca, tratamiento de arritmia, y cultivo celular por ejemplo. El tejido del corazón se descelulariza primero, dejando solo la matriz extracelular. La matriz se liofiliza después, se muele o pulveriza en un polvo fino, y se disuelve con pepsina u otras enzimas tales como, pero no limitadas a, metaloproteasas de matriz, colagenasas, y tripsina.

Para terapia con gel, la disolución se neutraliza y se lleva hasta la concentración apropiada usando PBS/disolución salina. En una realización, la disolución se puede inyectar a través de una aguja dentro del miocardio (ya sea a través de un catéter, a través de las costillas, o durante un procedimiento abierto en el pecho. El tamaño de la aguja puede ser sin limitación 22g, 23g, 24g, 25g, 26g, 27g, 28g, 29g, 30g, o menor. En una realización, el tamaño de la aguja a través de la cual se inyecta la disolución es 27g. La administración también se puede realizar a través de un catéter de infusión de balón u otro catéter no de aguja. Las cantidades de dosificación y frecuencia pueden determinarse rutinariamente basándose en el estado variable del tejido lesionado y en el perfil del paciente. A temperatura corporal, la disolución puede formar entonces un gel. En otra realización más, el gel se puede reticular con glutaraldehído, formaldehído, moléculas bis-NHS, u otros reticulantes.

En otra realización más, la ECM se puede combinar con otros agentes terapéuticos, tales como células, péptidos, proteínas, ADN, fármacos, nutrientes, antibióticos, aditivos promotores de supervivencia, proteoglicanos, y/o glicosaminoglicanos. En otra realización más, la ECM se puede combinar y/o reticularse con un polímero sintético. Los ejemplos de polímeros sintéticos incluyen, pero no se limitan a: fibra de poli(tereftalato de etileno) (DACRON™), poli(tetrafluoroetileno) (PTFE), poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(etilenglicol) (PEG), poli(diacrilato de etilenglicol) (PEGDA), poli(etileno), poli(estireno) y nitinol.

La disolución o gel de ECM se podría inyectar en el área del infarto, zona fronteriza o miocardio solo o en combinación con los componentes descritos anteriormente para el crecimiento celular endógeno, angiogénesis, y regeneración. La combinación podría también usarse sola o en combinación con componentes descritos anteriormente como una matriz para cambiar las propiedades mecánicas del corazón y/o prevenir la remodelación negativa del ventrículo izquierdo. La composición podría administrarse con células solas o en combinación con los componentes anteriormente descritos para regenerar el miocardio. La composición se podría usar sola o en combinación con componentes descritos anteriormente para crear un bloque de conducción para tratar arritmias.

Cuando se prepara un reactivo soluble, la disolución se lleva a cabo en una disolución de pH bajo que incluye, pero no se limita a, ácido acético 0,5 M, 0,1, ó 0,01 M o HCl 0,1 M a la concentración deseada y después se coloca en placas/pocillos de cultivo de tejidos, cubreobjetos, armazones u otras superficies para el cultivo de tejidos. Después de colocarla en una incubadora a 37°C durante 1 hora, o durante la noche a temperatura ambiente, se separa el exceso de disolución. Después de enjuagar las superficies con PBS, las células se pueden cultivar sobre la matriz adsorbida. La disolución se puede combinar previamente con péptidos, proteínas, ADN, fármacos, nutrientes, aditivos promotores de supervivencia, proteoglicanos, y/o glicosaminoglicanos antes, durante, o después de la inyección/implantación.

Se proporciona una unión celular y supervivencia mejoradas tanto en la composición terapéutica como en las formas de composición de cultivo de células adsorbidas de la matriz extracelular cardíaca *in vitro*. La forma reactiva de cultivo celular soluble de la matriz extracelular cardíaca induce una extensión más rápida, maduración más rápida, y/o supervivencia mejorada para los cardiomiocitos en comparación con los revestimientos de placas estándar.

Estudios previos han demostrado que es difícil usar cardiomiocitos derivados de células madre embrionarias humanas (hESC) para tratamiento del infarto de miocardio. En algunos casos, la diferenciación eficiente y el rendimiento *in vivo* de cardiomiocitos ventriculares maduros ha obstaculizado la eficacia del tratamiento. Anteriormente, la modulación de la diferenciación se ha abordado en gran medida *in vitro*, por ejemplo, con la adición de factores solubles a los medios de cultivo celular. Este procedimiento ha sido limitado por la dificultad de diferenciar más allá de un fenotipo fetal.

Además de los factores solubles, la matriz extracelular puede jugar también un papel importante en la diferenciación celular. Se han investigado algunas matrices que comprenden señales químicas para células adultas, que incluyen progenitoras adultas, aunque se ha realizado un trabajo limitado sobre los efectos de la ECM en las ESCs, en particular para las hESC. En muchos casos, cardiomiocitos derivados de hESCs se administran en una mezcla pro-supervivencia que consiste en factores solubles y matrigel.

Se describe una matriz biomimética obtenida de tejido cardíaco nativo. En algunos casos, una matriz se asemeja al ambiente cardíaco *in vivo* en que contiene muchas o todas las señales químicas nativas que se encuentran en la ECM cardíaca natural. En algunos casos, a través de reticulación o adición de otros materiales se pueden imitar también las propiedades mecánicas del miocardio sano adulto o embrionario. Como se describe en esta memoria, la ECM cardíaca se puede aislar y transformar en un gel usando un procedimiento simple y económico, que es susceptible de ampliarse para su traducción clínica.

En algunos casos, una composición como se proporciona en la presente invención puede comprender una matriz y células añadidas o incorporadas exógenamente. Las células pueden ser cualquier variedad de células. En algunos casos, las células son una variedad de células cardíacas o cardiovasculares que incluyen, pero no se limitan a: células madre, progenitores, cardiomiocitos, células vasculares, y fibroblastos obtenidos de fuentes autólogas o alogénicas.

La invención proporciona así una disolución que se convierte en un gel preparado a partir de matriz extracelular cardíaca descelularizada nativa, que se puede usar para soportar cardiomiocitos neonatales aislados o cardiomiocitos derivados de células madre progenitoras *in vitro* y actuar como un almacén gelificante *in situ*, proporcionando una matriz natural para mejorar la retención y supervivencia celulares en la pared del ventrículo izquierdo. Un almacén creado a partir de ECM cardíaca es muy adecuado para el trasplante de células en el miocardio, ya que se aproxima más completamente al ambiente *in vivo* en comparación con los materiales actualmente disponibles.

Una composición que comprende ECM cardíaca y células añadidas exógenamente se puede preparar cultivando las células en la ECM. Además, cuando se añaden proteínas tales como factores de crecimiento a la matriz extracelular, las proteínas se pueden añadir a la composición, o las moléculas proteicas pueden estar unidas de forma covalente o no covalente a una molécula en la matriz. La unión covalente de proteína a moléculas de matriz se puede lograr mediante procedimientos estándar de unión covalente de proteínas conocidos en la técnica. La proteína puede estar covalentemente enlazada o unida a una o más moléculas de la matriz.

Cuando se administra una composición que comprende la ECM cardíaca descelularizada y células exógenas, las células pueden ser de fuentes celulares para tratar el miocardio que incluyen fuentes alogénicas, xenogénicas, o autógenas. En consecuencia, mediante una composición de la presente invención se pueden administrar células madre embrionarias no humanas, células madre derivadas de fetos o adultos, células madre pluripotentes inducidas, cardiomiocitos progenitores, cardiomiocitos fetales y neonatales, miofibroblastos, mioblastos, células mesenquimales, células parenquimatosas, células epiteliales, células endoteliales, células mesoteliales, fibroblastos, células madre hematopoyéticas, células progenitoras derivadas de la médula ósea, células esqueléticas, macrófagos, adipocitos, y cardiomiocitos expandidos autotrasplantados. En algunos casos, las células de la presente invención se pueden cultivar *ex vivo* y en el entorno de la placa de cultivo diferenciarse ya sea directamente a células del músculo cardíaco, o a células de la médula ósea que pueden convertirse en células del músculo cardíaco. Las células cultivadas se trasplantan después al mamífero, ya sea con la composición o en contacto con el almacén y otros componentes.

Las células madre adultas son además otra especie de células que pueden formar parte de una composición de la presente invención. Se cree que las células madre adultas funcionan generando otras células madre (por ejemplo, las apropiadas al miocardio) en un nuevo sitio, o se diferencian directamente a un cardiomiocito *in vivo*. También pueden diferenciarse en otros linajes después de la introducción a órganos tales como el corazón. El mamífero adulto proporciona fuentes para células madre adultas en células precursoras endoteliales circulantes, células derivadas de la médula ósea, tejido adiposo, o células de un órgano específico. Se sabe que las células mononucleares aisladas de aspirado de médula ósea se diferencian en células endoteliales *in vitro* y se detectan en los vasos sanguíneos recién formados después de inyección intramuscular. Por tanto, el uso de células de aspirado de médula ósea puede producir células endoteliales *in vivo* como un componente de la composición. Otras células que se pueden utilizar son células madre mesenquimales administradas con citoquinas activadoras. Se ha demostrado que subpoblaciones de células mesenquimales se diferencian hacia líneas celulares miogénicas cuando se exponen a citoquinas *in vitro*.

Cardiomiocitos derivados de células madre embrionarias no humanas pueden cultivarse en una composición de la presente invención que comprende una matriz cardíaca. En algunos casos, cardiomiocitos derivados de ESCs cultivados en presencia de una composición de la presente invención proporcionan una morfología más similar a *in vivo*. En algunos casos, cardiomiocitos derivados de ESCs cultivados en presencia de una composición de la presente invención proporcionan marcadores de maduración aumentados.

Se proporciona también un sistema de administración de fármacos que comprende una matriz extracelular cardíaca descelularizada para administrar células, fármacos, moléculas, o proteínas en un sujeto para tratar tejidos u órganos defectuosos, enfermos, dañados o isquémicos. El material biocompatible de la invención que comprende la matriz extracelular cardíaca descelularizada sola o en combinación con otros componentes se puede usar como un bloque de conducción no destructivo para el tratamiento de arritmias. Por tanto, el material biocompatible de la invención puede usarse para trasplantar células, o inyectarse solo para incorporar células nativas u otros agentes terapéuticos endógenos citoquiales, o actuar como un vehículo de administración de agente terapéutico exógeno.

- La composición de la invención puede comprender además células, fármacos, proteínas u otro material biológico tales como, pero sin limitarse a, eritropoyetina (EPO), factor de células madre (SCF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento transformante (TGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de cartílago (CGF), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento esquelético (SGF), factor de crecimiento derivado de osteoblastos (BDGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento insulínico (IGF), factor de crecimiento de citoquinas (CGF), factor de células madre (SCF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), suplemento para el crecimiento de células endoteliales (EGGS), factor estimulador de colonias (CSF), factor de diferenciación del crecimiento (GDF), factor modulador de integrinas (IMF), calmodulina (CaM), timidina quinasa (TK), factor de necrosis tumoral (TNF), hormona del crecimiento (GH), proteínas morfogenéticas del hueso (BMP), metaloproteínasa de matriz (MMP), inhibidor tisular de metaloproteínasa de matriz (TIMP), interferón, interleuquinas, citoquinas, integrina, colágeno, elastina, fibrillinas, fibronectina, laminina, glicosaminoglicanos, hemonectina, trombospondina, sulfato de heparán, dermatán, sulfato de condroitina (CS), ácido hialurónico (HA), vitronectina, proteoglicanos, transferrina, citotactina, tenascina, y linfoquinas.
- 5 Las placas de cultivo tisular se pueden revestir con un ligando soluble o una forma de gel de la matriz extracelular de la invención, o una forma adsorbida de la matriz extracelular de la invención, para cultivar cardiomiocitos u otros tipos de células relevantes para la reparación cardíaca. Esto se puede usar como un reactivo de investigación para cultivar estas células o como un reactivo clínico para cultivar las células antes de la implantación. El reactivo de matriz extracelular se puede combinar con otras matrices tisulares y células.
- 10 15
- 20 Para las composiciones reactivas en gel, la disolución se neutraliza y se lleva hasta la concentración apropiada usando PBS/disolución salina u otro tampón, y después se coloca en placas y/o pocillos de cultivo tisular. Una vez colocada en una incubadora a 37°C, la disolución forma un gel que se puede usar para cualquier sustrato de cultivo 2D ó 3D para cultivo celular. La composición en gel puede reticularse con glutaraldehído, formaldehído, moléculas bis-NHS, u otros reticulantes, o combinarse con células, péptidos, proteínas, ADN, fármacos, nutrientes, aditivos promotores de supervivencia, proteoglicanos, y/o glicosaminoglicanos, o combinarse y/o reticularse con un polímero sintético para uso adicional.
- 25
- También se proporciona un método para cultivar células adsorbidas sobre una matriz extracelular cardíaca descelularizada que comprende las etapas de: (a) proporcionar una disolución que comprende el material biocompatible de ECM descelularizada en disolución de bajo pH, que incluye, pero no se limita a, ácido acético 0,5 M ó 0,01 M, o HCl 0,1 M a una concentración deseada, (b) colocar dicha disolución en placas o pocillos de cultivo de tejidos, (c) incubar dichas placas o pocillos de cultivo de tejidos por encima de la temperatura ambiente tal como a 37°C, durante entre 1 hora y una noche (o a temperatura ambiente hasta 40°C), (d) separar la disolución en exceso, (e) enjuagar dichas placas o pocillos de cultivo de tejidos con PBS, y (f) cultivar células sobre la matriz adsorbida. Las células que pueden cultivarse sobre la matriz adsorbida que comprende la matriz extracelular cardíaca descrita en la presente memoria incluyen cardiomiocitos u otros tipos de células relevantes para la reparación cardíaca, incluso células madre y progenitores cardíacos.
- 30 35
- En algunos casos, una composición comprende reticuladores que incluyen, pero no se limitan a, reticuladores de colágeno comunes, reticuladores de ácido hialurónico, u otros reticuladores de proteínas con degradación y propiedades mecánicas alteradas.
- 40 En un caso, un método para producir la composición de la presente invención comprende electrohilado. En algunos casos, un método de la presente invención está configurado para controlar el tamaño, forma, o espesor de las nanofibras.
- En algunos casos, puede inducirse contractilidad en la composición, por ejemplo, con células o estimulación externa. La contractilidad puede crear estrés cíclico para promover un miocardio más natural.
- 45 En algunos casos, pueden inducirse en la composición la afluencia de células y la angiogénesis, por ejemplo, cuando la composición comprende grupos enlazados o factores embebidos tales como factores angiogénicos.
- En algunos casos, una composición de la presente invención puede contener microperlas. Las microperlas pueden ser una parte de la composición o suministradas por la composición. Microperlas ejemplares pueden ser cualquier variedad de materiales, por ejemplo naturales o sintéticos. En algunos casos, las microperlas pueden tener propiedades de degradación variadas o comprender, por ejemplo, inhibidores de MMP, factores de crecimiento o moléculas pequeñas.
- 50
- En algunos casos, la composición puede comprender un grupo biológico que puede actuar como adhesivo o anclaje en donde se suministra la composición.
- 55 En un caso, una composición puede ser un bioadhesivo, por ejemplo para reparación de heridas. En algunos casos, una composición de la presente invención puede configurarse como un adherente celular. Por ejemplo, la composición de la presente invención puede ser un revestimiento o estar mezclada sobre un dispositivo médico o un producto biológico que comprende o no células. Por ejemplo, la composición de la presente invención puede ser un

revestimiento para un injerto vascular de polímeros sintéticos. En algunos casos, la composición incluye un antibacteriano o se podrían incluir agentes antibacterianos.

5 Los métodos de la presente invención pueden comprender administrar la composición como un dispositivo de reparación de heridas. Por ejemplo, después de la ablación cardíaca, la composición puede administrarse para mejorar la cicatrización.

En un caso, una composición comprende una perla de alginato que está revestida con una composición de ECM como se describe en la presente memoria.

10 En algunos casos, la composición es inyectable. Una composición inyectable puede ser, sin limitación, un polvo, líquido, partículas, fragmentos, gel, o emulsión. La composición inyectable se puede inyectar en un corazón o en muchos casos inyectarse en el ventrículo izquierdo, ventrículo derecho, aurícula izquierda, aurícula derecha, o válvulas de un corazón. Las composiciones de la invención pueden incorporar, por ejemplo sin limitación, células endoteliales, del músculo liso, progenitores cardíacos, miofibroblastos, células madre, y cardiomiocitos.

Los métodos para producir las composiciones de la presente invención pueden incluir descelularizar tejido de cualquier animal o humano de edad por métodos bien conocidos en la técnica.

15 En algunos casos, una composición de la presente invención comprende ECM y un polímero sintético o natural. Por ejemplo, una composición de la presente invención comprende un polímero natural tal como colágeno, quitosano, alginato, glicosaminoglicanos, fibrina, o ácido hialurónico. En otro ejemplo, una composición de la presente invención comprende un polímero sintético, por ejemplo sin limitación, poli(etilenglicol), poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico), polihidroxiácidos, poli(dioxanona), poli(caprolactona), poliortoésteres, polianhídridos, polifosfacenos, poliaminoácidos, pseudo-poli-aminoácidos, polímeros conductores (tales como poli(acetileno), poli(pirrol), poli(anilina)), o poliuretano o sus copolímeros potenciales. En algunos casos, una composición de la presente invención comprende ECM y tanto un polímero natural como un polímero sintético. Una composición de la presente invención puede ser un material múltiple enlazando una ECM y otro material polimérico, por ejemplo, mediante reacción con aminas, tioles libres, o péptidos cortos que se pueden ensamblar con la ECM.

25 Los métodos para la administración de una composición que comprende una ECM pueden incluir, pero sin limitarse a: inyección directa durante la cirugía; inyección directa a través de la pared torácica; administración a través de un catéter en el miocardio a través del endocardio; administración a través de vasos coronarios; y administración a través de catéter con balón de infusión. Una composición se puede administrar también en una formulación sólida, tal como un injerto o parche o asociada con un armazón celular. Las dosis y la frecuencia variarán dependiendo de las necesidades del paciente y del juicio del médico.

30 En algunos casos, una composición puede ser un revestimiento. Un revestimiento puede comprender una ECM de cualquier tejido, por ejemplo músculo cardíaco, músculo esquelético, pericardio, hígado, tejido adiposo, y cerebro. Se puede usar un revestimiento para aplicaciones de cultivo de tejidos, tanto de investigación como clínicas. El revestimiento se puede usar para revestir, por ejemplo sin limitación, armazones/materiales sintéticos u otros productos biológicos, o implantes. En algunos casos, un revestimiento se texturiza o modela. En algunos casos, un método para producir un revestimiento incluye adsorción o enlace químico. Se puede formar un gel fino o revestimiento adsorbido usando una forma de disolución de ECM de la composición. En algunos casos, una composición de la presente invención se configura para sellar agujeros en el corazón tales como defectos de septo.

40 Las composiciones pueden usarse como revestimiento para productos biológicos, dispositivos médicos o dispositivos de administración de fármacos.

45 La matriz extracelular consiste en una red compleja, específica de tejidos, de proteínas y polisacáridos, que ayudan a regular el crecimiento, supervivencia y diferenciación celulares. A pesar de la naturaleza compleja de la ECM natural, los estudios celulares *in vitro* tradicionalmente evalúan el comportamiento de las células sobre revestimientos con componentes ECM individuales, lo que plantea limitaciones al traducir los hallazgos de estudios celulares *in vitro* al entorno *in vivo*. Normalmente, las proteínas de matriz purificadas de diversas fuentes animales se adsorben en sustratos de cultivo celular para proporcionar un sustrato proteico para la fijación celular y para modificar el comportamiento celular. Sin embargo, estos enfoques no proporcionarían una representación exacta del microambiente complejo. Se han usado revestimientos más complejos, tales como una combinación de proteínas individuales, y aunque estas señales combinatorias han demostrado que afectan al comportamiento celular, no es tan completa como *in vivo*. Para una matriz más natural, se han usado matrices derivadas de células. Matrigel es un sistema complejo; sin embargo, se deriva del sarcoma de ratón y no imita a ningún tejido natural. Aunque muchos componentes de la ECM son similares, cada tejido u órgano tiene una composición única, y una fuente derivada naturalmente y específica de un tejido puede resultar ser una mejor imitación del microambiente celular.

55 La matriz extracelular (ECM) consiste en una red compleja, específica de tejidos, de proteínas y polisacáridos, que ayudan a regular el crecimiento, supervivencia y diferenciación celulares. A pesar de la naturaleza compleja de la ECM muscular, los estudios celulares *in vitro* tradicionalmente evalúan el comportamiento de las células musculares en revestimientos de componentes ECM individuales, lo que plantea limitaciones al traducir los hallazgos de estudios celulares *in vitro* al entorno *in vivo*. La superación de esta limitación es importante para las terapias

mediadas por células, que dependen de células cultivadas y expandidas que conservan el comportamiento de las células nativas con el tiempo.

5 En la presente memoria se describe una composición que comprende ECM que se obtiene de músculo esquelético y cardíaco de porcino. La composición se puede desarrollar para revestir sustratos para una variedad de aplicaciones. En algunos casos, la ECM de la composición retiene una mezcla compleja de componentes ECM específicos de músculo tras la disolución. En algunos casos, los revestimientos de la presente invención pueden emular de manera más apropiada la ECM de músculo nativo *in vitro*.

10 La Figura 2 ilustra el área miofibrilar media de cardiomiocitos que era significativamente mayor cuando se cultivaron en ECM cardíaca en comparación con el revestimiento estándar de gelatina. La Figura 3 ilustra que el número medio de cardiomiocitos fue significativamente mayor en ECM cardíaca en comparación con el revestimiento estándar de gelatina. Como se ilustra en la Figura 4, la desmoplaquina, una proteína de unión intracelular, se localizó específicamente entre cardiomiocitos y formó desmosomas organizados el día 112 en ECM cardíaca, pero no en gelatina.

15 Como se describe en la presente memoria, se puede crear una matriz de músculo esquelético de la misma manera o de manera similar a la ECM cardíaca. Aunque no según la presente invención, la matriz de músculo esquelético se pudo inyectar en músculo esquelético para ingeniería del tejido muscular esquelético. La Figura 5 ilustra mioblastos esqueléticos cultivados en matriz de músculo esquelético como se describe en la presente memoria, que demostró un aumento del tamaño de los miotubos, mayor diferenciación, y tenía más núcleos por miotubo que los mioblastos cultivados en colágeno. Usando un ensayo de migración transwell, *in vitro*, los mioblastos esqueléticos migran específicamente hacia la matriz del músculo esquelético como se ilustra en la Figura 6.

20 La invención se ilustra adicionalmente mediante los ejemplos siguientes, que no deben interpretarse en modo alguno como limitaciones impuestas sobre el alcance de la misma. Es evidente para los expertos en la técnica que son posibles diversas modificaciones y cambios y se consideran dentro del alcance de la presente invención siempre que estén dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

25 Ejemplo 1

Diversos estudios para tratar el MI han investigado la inyección de células directamente en la pared del infarto, aunque muchos estudios han mostrado tasas de supervivencia deficientes. El objetivo de este estudio es examinar el uso de un gel como plataforma de crecimiento para la adhesión, crecimiento, maduración y administración celulares *in vivo*. Se prevé que un gel compuesto de tejido de matriz extracelular cardíaca nativa puede ayudar en la regeneración de tejido cardíaco promoviendo la supervivencia celular.

30 A ratas hembra Sprague Dawley se les aplicó la eutanasia y sus corazones se descelularizaron usando un procedimiento modificado de Ott et al. (Nature Medicine, 14(2), 213, 2008). Los corazones descelularizados se liofilizaron después, se rehidrataron, se pulverizaron, y se liofilizaron de nuevo para formar un polvo seco. La ECM se digirió entonces mínimamente en pepsina y se neutralizó, como se modificó a partir de Freytes et al. (Biomaterials 29: 1630, 2008).

Más específicamente, las ratas Sprague Dawley hembra adultas fueron heparinizadas y anestesiadas intraperitonealmente con pentobarbital. Se cortó la aorta y la arteria pulmonar y se extrajo el corazón. La aorta se canalizó y se unió a un sistema de Langendorff modificado.

40 El corazón se descelularizó usando una técnica modificada publicada previamente. Brevemente, los vasos coronarios del corazón se perfundieron por vía retrógrada con una disolución de dodecilsulfato sódico al 1% y PBS durante 24 horas y después una disolución de triton al 1% en PBS durante 30 minutos. Una vez completada la descelularización, el corazón se enjuagó con agua desionizada y se liofilizó en un liofilizador.

45 Los corazones congelados se rehidrataron con agua y luego se sumergieron en nitrógeno líquido. Una vez congelados, los corazones se aplastaron sistemáticamente dentro de un aparato de bola y copa a 70 psi (482,65 kPa) durante 10 segundos. Las partículas de corazón pulverizadas se liofilizaron después. Una vez seco, el tejido cardíaco liofilizado se combinó con pepsina al 1% y se mezcló con HCl 0,01 M a una concentración de 10 mg/mL. La disolución se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas para permitir la disolución del tejido de la matriz extracelular. Después de 48 horas, la disolución de HCl se dividió en alícuotas en tubos Eppendorf sobre hielo y se neutralizó con NaOH 0,1 N a pH 7,4.

50 A través de los métodos descritos anteriormente, se ha formado un gel nativo de ECM cardíaca de rata. La gelificación exitosa de geles de 2,5-8 mg/mL se produjo en 15 minutos, como se confirma por la mayor naturaleza viscosa del material. Se observó mayor rigidez con geles de mayor densidad.

55 La disolución neutralizada se diluyó a la concentración con 1 x PBS, se distribuyó en una placa de 96 pocillos a 50 μ L por pocillo, y después se transfirió a una incubadora a 37°C y CO₂ al 5%. Después de que se había formado el gel, 100 μ L de células cardiomiocitos neonatales aisladas 2d se pipetearon en la parte superior del gel a 60.000 células por pocillo. Después de varios días se examinaron las células para detectar la adherencia a los geles.

Después de que el tejido de la matriz extracelular cardíaca se había descelularizado, pulverizado y digerido, se formó un gel una vez que la disolución se había llevado a condiciones fisiológicas (pH = 7,4, 37°C). Los geles formados con mayores concentraciones de tejido de ECM en disolución eran más rígidos y más opacos que los geles formados con concentraciones más pequeñas de ECM. Las células en placas de cultivo sobre geles fueron capaces de adherirse y sobrevivir sobre los geles.

La siembra de cardiomiocitos en placas sobre los geles de ECM cardíaca a 1×10^4 mostró una supervivencia y adherencia satisfactorias de las células a la ECM. Las células se cultivaron en la ECM durante un período de hasta cuatro días.

Se inyectaron cien mL de disolución de ECM cardíaca (7 mg/mL) a través de una aguja de 30G en la pared libre del LV de una rata anestesiada. El presente estudio muestra que la matriz extracelular de corazón nativa se puede aislar, disolverse y auto-ensamblarse en un gel cuando se lleva a pH y temperatura fisiológicos. Puesto que el gel contiene todos los componentes de la matriz extracelular nativa, aunque estén revueltos, se prevé que esta matriz permite la adherencia y crecimiento satisfactorios de cardiomiocitos *in vitro* y también una vez inyectada *in vivo*. Además, se cree que un gel compuesto de la matriz obtenida originalmente de los ventrículos cardíacos soporta el crecimiento de cardiomiocitos más satisfactoriamente que otras matrices tales como geles de colágeno o de fibrina, ya que imita más completamente el entorno cardíaco *in vivo*.

Un gel inyectable puede conformarse potencialmente en cualquier forma tridimensional y mejorar la supervivencia del trasplante celular dentro del corazón. Los cardiomiocitos inyectados o células que pueden diferenciarse en cardiomiocitos pueden ayudar a la regeneración del tejido del corazón, mejorar el rendimiento cardíaco. El método desarrollado para crear una plataforma de geles de ECM cardíaca nativa con concentración y rigidez variadas proporciona también una plataforma *in vitro* para el crecimiento celular y como un armazón de ingeniería *in situ* para generación. La ECM nativa proporciona el ambiente complejo apropiado cuando se inyecta *in vivo* para aumentar la retención celular y promover la regeneración tisular para ingeniería del tejido miocárdico.

Ejemplo 2

Se han cultivado típicamente cardiomiocitos sobre superficies revestidas con una o posiblemente varias proteínas de matriz extracelular (ECM). Sin embargo, *in vivo*, existen cardiomiocitos en un medio extracelular altamente complejo; una ECM que imita más completamente este ambiente nativo puede ser beneficiosa para la supervivencia de los cardiomiocitos en cultivo. En esta memoria se describe el uso de ECM cardíaca nativa que se ha disuelto como un revestimiento para cultivo celular de cardiomiocitos neonatales.

Se extrajeron corazones de ratas Sprague-Dawley y se descelularizaron usando un sistema de Langendorff modificado (modificado de Ott et al., 2008). Los corazones descelularizados se liofilizaron, rehidrataron y pulverizaron tras congelación en N₂ líquido. La ECM se digirió mínimamente en pepsina en HCl 0,01 M. Después de 48 horas, se añadió ácido acético 0,01 M para producir la concentración final de 1 mg/ml.

Se cosecharon miocitos cardíacos a partir de ventrículos recién disecados de ratas Sprague-Dawley de 1 a 2 días usando un estuche de aislamiento (Cellutron, Highland Park, NJ). El sobrenadante inicial se desechó, pero las subsiguientes digestiones de 20 minutos se colaron y suspendieron en DMEM suplementado con M199 al 17%, suero equino al 10%, suero bovino fetal al 5%, y penicilina/estreptomina al 1%. Después del aislamiento, el sobrenadante se pre-sembró en placas de poli(estireno) de cultivo tisular para aumentar la pureza de los cardiomiocitos a través de la adherencia selectiva de fibroblastos.

Se adsorbió 1 mg/ml de ECM cardíaca nativa o colágeno I (Sigma, St. Louis, MO) sobre cubreobjetos de vidrio durante una hora a 37°C. Se sembraron en placas cardiomiocitos neonatales aislados a una densidad de 200.000/cm² y se cambió el medio a bajo mantenimiento sérico después de 24 horas (DMEM, M199 al 18,5%, HS al 5%, FBS al 1% y antibióticos). Los cultivos celulares se mantuvieron a 37°C y CO₂ al 5%, se monitorizaron diariamente, y se intercambiaron medios de mantenimiento de nueva aportación cada 2-3 días.

Los cardiomiocitos se adhirieron a la ECM nativa adsorbida, y formaron una capa parcialmente confluyente. Inicialmente, los cardiomiocitos se adherían con una densidad similar al revestimiento de colágeno.

Ambos cultivos celulares comenzaron a latir espontáneamente el día 3 después de sembrarlos en placas. Los cardiomiocitos cultivados en colágeno comenzaron a separarse el día 12 y dejaron de latir el día 14. Sin embargo, los cardiomiocitos cultivados en la ECM cardíaca nativa formaron fibrillas claramente definidas, que latieron a la misma velocidad hasta el día 28.

Este estudio demostró que el uso de ECM cardíaca nativa para cultivo de cardiomiocitos es útil porque imita más completamente las condiciones *in vivo*. El estudio también prevé que los cardiomiocitos neonatales se adhieren y continúan funcionando más tiempo en la ECM cardíaca nativa que en el típico revestimiento de colágeno. Este nuevo revestimiento superficial es beneficioso para el cultivo de cardiomiocitos derivados de células madre así como progenitores cardíacos.

Ejemplo 3

En este caso se ha investigado el uso de revestimiento celular para la matriz extracelular cardíaca nativa de ventrículos adultos que se han descelularizado y disuelto. Las ventajas son que la ECM cardíaca nativa puede tener más componentes que los revestimientos celulares tradicionales, y estar más fácilmente disponible para su uso que el pretratamiento con otros tipos de células.

5 Se extrajeron corazones de ratas Sprague-Dawley, y se descelularizaron usando un sistema de Langendorff modificado (modificado de Ott et al, 2008). Los corazones descelularizados se liofilizaron, rehidrataron y pulverizaron después de congelar en nitrógeno líquido. La ECM se digirió después en pepsina en HCl 0,1 M. Después de 48 horas de digestión, se añadió ácido acético 0,01 M para diluir a la concentración final de 1 mg/ml.

10 La digestión, con pepsina, de la ECM cardíaca nativa se realizó en electroforesis vertical en gel en condiciones reductoras usando DTT y se comparó frente a laminina (BD Biosciences), y colágeno de piel de ternero (Sigma). Los geles se tiñeron con Imperial Protein Stain (Pierce). La ECM cardíaca nativa puede demostrar una mezcla más compleja de componentes de ECM cuando se compara con colágeno y laminina.

15 Se recogieron miocitos cardíacos de los ventrículos de ratas Sprague-Dawley de 1 a 2 días de edad usando un estuche de aislamiento (Cellutron, Highland Park, NJ). El sobrenadante inicial se descartó, pero las subsiguientes digestiones de 20 min se colaron y suspendieron en DMEM suplementado con M199 al 17%, suero equino al 10%, suero bovino fetal al 5%, y penicilina/estreptomina al 1%. Después del aislamiento, el sobrenadante se pre-sembró en placas de poli(estireno) de cultivo tisular para aumentar la pureza de los cardiomiocitos a través de la adherencia selectiva de fibroblastos.

20 1 mg/ml de ECM cardíaca nativa o colágeno I (Sigma, St. Louis, MO) se adsorbió en placas de cultivo tisular de 48 pocillos durante 1 hora a 37°C. Se sembraron en placas cardiomiocitos neonatales aislados a una densidad de 200.000/cm² y se cambió el medio a bajo mantenimiento sérico después de 24 horas (DMEM, M199 al 18,5%, HS al 5%, FBS al 1% y penicilina/estreptomina al 1%). Los cultivos celulares se mantuvieron a 37°C y dióxido de carbono al 5%, se monitorizaron diariamente, y se añadieron medios de nueva aportación cada 2-3 días. Los cultivos se fijaron el día 2, día 4, y día 7 y se tiñeron para alfa-actinina, conexina43, pan-cadherina, actina y núcleos. Los cardiomiocitos comenzaron a latir espontáneamente en cultivo el día 2. Las células cultivadas en colágeno comenzaron a separarse de la placa el día 8. Un conjunto de células cultivadas en ECM cardíaca nativa continuaron latiendo hasta el día 45. Todas las células cultivadas en colágeno dejaron de latir el día 14.

30 Los revestimientos actuales de cultivos celulares son generalmente proteínas simples adsorbidas sobre placas o armazones de cultivo tisular. El uso de un ambiente más complejo es beneficioso para la supervivencia y maduración celular. Se demostró mediante este estudio que la ECM cardíaca nativa contiene más componentes complejos en comparación con otros revestimientos de cultivo celular estándar. Los cardiomiocitos neonatales de rata se unieron a ECM cardíaca nativa como un revestimiento para cultivo celular, y comenzaron espontáneamente a latir. Los cardiomiocitos cultivados en ECM cardíaca nativa demostraron aumento de tinción de actina, conexina43, y pan-cadherina con el tiempo. También, los cardiomiocitos neonatales habían aumentado la supervivencia y unión sobre la ECM cardíaca nativa en comparación con el colágeno.

Ejemplo 4

En este caso se investiga el uso de un gel como se describe en la presente memoria, en donde el gel se prepara a partir de ECM cardíaca descelularizada nativa. El gel puede actuar como un armazón de gelificación *in situ*, proporcionando una matriz cardíaca natural para mejorar la retención y supervivencia celulares en la pared del LV.

40 Se han descelularizado corazones de ratas Sprague Dawley hembra y corazones de porcino. El tejido cardíaco se cortó en rodajas para tener un grosor de ~2 mm y se enjuagó con agua desionizada, después se agitó en dodecilsulfato sódico al 1% (SDS) hasta descelularizar, 4-5 días. Una etapa de agitación adicional en Triton X-100 al 1% durante 30 minutos garantizó una descelularización completa y fue seguida por una agitación durante la noche en agua desionizada y un enjuague final en agua desionizada.

45 Los corazones descelularizados se liofilizaron después, se pulverizaron o molieron, y se liofilizaron nuevamente para formar un polvo seco. La ECM se digirió a continuación en pepsina y se neutralizó.

50 La ECM cardíaca disuelta se llevó entonces a pH fisiológico u 8, a través de la adición de hidróxido sódico y 10X PBS. La disolución de matriz extracelular cardíaca neutralizada se diluyó después con PBS hasta la concentración deseada y se dejó gelificar en placas de 96 pocillos a 37°C. La gelificación satisfactoria de geles de 2,5-8 mg/mL se confirmó mediante inspección visual del material. Se observó mayor rigidez con geles de mayor concentración.

55 Se probaron diversas condiciones experimentales para determinar la digestión diferente para la gelificación de armazones de ECM cardíaca. Se realizó electroforesis vertical en geles para comparar el contenido de las condiciones de digestión, y para comparar el contenido de ECM con colágeno de cola de rata. Se determinó que el pH inicial jugaba un papel importante en la digestión y gelificación de ECM cardíaca. Las digestiones se realizaron durante 48-72 horas.

5 La electroforesis en gel revela una digestión incompleta de ECM cardíaca nativa mediante HCl 0,01 M. Las digestiones de ECM cardíaca en HCl 0,1 M mostraron una mayor degradación. Así, se demostró que las condiciones ácidas más fuertes mejoran la digestión y gelificación de las disoluciones de ECM cardíaca. La comparación de la ECM cardíaca con colágeno de cola de rata demuestra la presencia de diversos péptidos adicionales en la ECM cardíaca.

Se usó microscopía electrónica de barrido para visualizar la estructura de la forma de gel de matriz extracelular cardíaca. Los geles se fijaron con glutaraldehído al 2,5% durante 2 horas, seguido por una serie de enjuagues con etanol (30-100%), y se secaron por puntos críticos. Las muestras se revistieron con cromo mediante pulverización catódica antes de la formación de imágenes.

10 Se inyectó con éxito ECM nativa disuelta a una concentración de 6 mg/mL de ECM cardíaca a través de una aguja de 30G en la pared libre de LV de rata, creando un armazón gelificado *in situ*, al que los cardiomiocitos se adhieren y proliferan.

Ejemplo 5

15 Se probaron *in vitro* las propiedades quimioattractivas de la disolución de ECM descelularizada cardíaca usando un estuche de ensayo de migración disponible comercialmente. En resumen, células endoteliales de arteria coronaria humana (HCAECs) y células de músculo liso aórtico de rata (RASMCs) fueron privadas de suero y se evaluó la migración hacia la matriz, colágeno, pepsina, y suero bovino fetal. Las RASMCs muestran una migración significativa hacia la matriz, mientras que las HCAECs muestran una tendencia. Así, las señales bioquímicas de la matriz tienen propiedades quimioattractivas que podrían promover la infiltración celular *in vivo*.

20 *In vivo*, se cuantificó la formación de arteriolas dentro de la región inyectada para evaluar la formación neovascular. La densidad de arteriolas fue significativamente mayor a los 11 días después de la inyección, en comparación con 4 horas después de la inyección.

Ejemplo 6

25 Se ha demostrado que varios tipos de células preservan la función cardíaca cuando se inyectan en la pared miocárdica después de un MI. Sin embargo, un tratamiento acelular podría eliminar las complicaciones de una deficiente supervivencia celular y de la respuesta inmune, común con las terapias celulares.

Se indujo infarto de miocardio en ratas usando un modelo de isquemia-reperusión de 25 min, mediante la oclusión de la arteria descendente anterior izquierda. Al cabo de una semana se calculó la función basal post-MI a partir de imágenes por resonancia magnética MRI.

30 Se descelularizó ECM miocárdica de porcino en pequeños trozos, en SDS al 1% durante varios días, seguido de un enjuague DI durante la noche, liofilización y molienda para crear un polvo. La digestión se realizó en HCl 0,1 M con pepsina para crear una forma disuelta del material.

35 La ECM disuelta se llevó a pH 7,4 usando NaOH 1 M y se diluyó con PBS para ser 6 mg/mL antes de la inyección. Tras la cirugía del MI, los animales se distribuyeron al azar en dos grupos y se inyectó ECM o disolución salina en la pared libre de LV de ratas Sprague Dawley hembra a través de una aguja de 30G, dos semanas después de la cirugía de infarto.

4 semanas después de la cirugía de inyección (6 semanas después del MI), la función cardíaca se evaluó de nuevo mediante MRI (imágenes por resonancia magnética).

40 Los animales inyectados con ECM mostraron una función preservada (según se evaluó basándose en la fracción de eyección) a las 6 semanas, mientras que los animales inyectados con disolución salina no mantuvieron la función cardíaca. El volumen diastólico final y el volumen sistólico final también se preservaron en los animales inyectados con ECM.

Ejemplo 7

45 Actualmente, las células madre y otros tipos de células están en ensayos clínicos para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca mediante administración a través de un catéter de 27G en la pared del miocardio. Se descelularizó tejido ventricular de porcino usando detergentes SDS, y se procesó para formar una forma disuelta de la matriz, y se neutralizó a pH fisiológico y se diluyó a 6 mg/mL para inyección.

Dos cerdos Yorkshire recibieron un infarto de miocardio inducido por bobina y fueron inyectados con matriz miocárdica sola o con células a los dos meses después del infarto.

50 Derivados de explantes cardíacos fetales se pre-etiquetaron con Dil, una mancha citoplasmática, para identificación histológica. Se utilizó un cóctel pro-supervivencia, que demuestra que mejora la supervivencia de las hESCs en un modelo de roedor.

Se inyectó la matriz sola o con células a una velocidad clínicamente relevante de 0,2 mL por 30 segundos a través de un catéter, guiado por la cartografía NOGA. Se hicieron 5 inyecciones de 0,1 mL cada una de matriz sola o con células en regiones de zona de borde del infarto.

5 La matriz sola y la matriz con células fue capaz de ser inyectada con éxito en el corazón porcino, de forma mínimamente invasiva, sin obstruir el catéter delgado.

Ejemplo 8

En este caso se describe la investigación y uso de un gel derivado de tejido pericárdico descelularizado concerniente a su potencial como una terapia autóloga para mejorar la retención y supervivencia celulares en la pared del LV promoviendo la neovascularización *in vivo*.

10 Se han descelularizado pericardios porcinos y humanos. Se sacrificaron cerdos de cría machos juveniles y sus pericardios se descelularizaron mediante procedimientos modificados de Ott et al. (Nature Medicine, 14(2), 213, 2008). Específicamente, los pericardios se enjuagaron brevemente en agua DI, se agitaron en dodecilsulfato sódico (SDS) al 1% durante 24 horas, después se agitaron en agua DI durante aproximadamente 5 horas. Se recogieron muestras de tejido pericárdico humano de pacientes sometidos a cirugías cardioráxicas. Estas muestras se
15 descelularizaron de una manera similar: un enjuague DI breve, seguido por 3 días en SDS al 1%, seguido por un enjuague DI durante la noche. En ambos casos, la descelularización completa se verificó con tinción histológica.

Lo siguiente es válido para muestras de ECM pericárdicas tanto humanas como porcinas.

20 Pericardios descelularizados, o ECM pericárdica, se congelaron entonces, se liofilizaron y molieron para formar un polvo fino, seco. El polvo de ECM se digirió después con pepsina disuelta en HCl y se neutralizó, a través de métodos modificados de Freytes et al. (Biomaterials 29: 1630, 2008).

La electroforesis en gel (SDS-PAGE) indicó una mayor complejidad que en colágeno digerido con pepsina, mostrando un amplio intervalo de bandas más pequeñas en las muestras de pericardio.

25 Esta complejidad se confirmó analizando las muestras con espectrometría de masas para identificar fragmentos proteicos. Los fragmentos de proteínas de ECM identificados incluyeron colágeno, elastina, fibrina, y una variedad de proteoglicanos.

Cuando se cargaron 150 µl de la disolución neutralizada en una placa de 96 pocillos y se dejaron reposar en una incubadora, se observó la gelificación después de 2-3 horas.

30 La gelificación *in vivo* se observó inyectando 60 µl de la disolución de ECM neutralizada en la pared del ventrículo izquierdo (LV) de ratas macho Sprague Dawley. La tinción histológica de los corazones seccionados de los animales sacrificados 45 minutos después de la inyección mostró un área de ECM gelificada visible en la pared del LV.

En el mismo experimento se mantuvieron los animales durante dos semanas, después de las cuales se sacrificaron y se recogieron sus corazones para seccionar. La inyección de ECM era todavía visible en este momento, pero había sido infiltrada por células.

35 La inmunohistoquímica se realizó sobre rodajas de tejido con el fin de identificar las células de músculo liso y las células endoteliales, indicativas de vasos sanguíneos. La presencia de un gran número de vasos dentro del área de inyección de ECM indica que el material promueve la neovascularización.

Ejemplo 9

40 Los revestimientos de superficies para cultivo celular *in vitro* se han hecho típicamente de una o varias proteínas de matriz extracelular. Aunque esto proporciona una superficie adhesiva de células, no imita el microambiente extracelular *in vivo*. En la presente invención se desarrolló un método para generar revestimientos adsorbidos derivados de matrices extracelulares de diversos tejidos, que incluyen músculo cardíaco, esquelético, hígado, pericardio, tejido adiposo, y cerebro.

45 Se recogió tejido de origen porcino y de rata y se descelularizó. Tejido cardíaco, músculo esquelético, e hígado tanto de rata como de origen porcino y cerebro, grasa y pericardio de origen porcino se descelularizaron usando diversos detergentes. Se cortó tejido cardíaco, músculo esquelético y tejido hepático hasta tener un espesor de ~2 mm y se enjuagó con agua desionizada, después se agitó en dodecilsulfato sódico (SDS) al 1% en PBS hasta descelularizar. El tiempo que tardó en descelularizar dependió del tipo de tejido. Los cerebros se cortaron por la mitad y se agitaron lentamente en SDS al 0,001% en PBS. Se descelularizó tejido pericárdico en SBS al 1% en PBS, y se descelularizó
50 tejido adiposo en desoxicolato sódico 2,5 mM, y después se procesaron adicionalmente con lipasa. También se han probado otros agentes de descelularización. Después se enjuagó el tejido descelularizado en agua desionizada para asegurar la separación de los detergentes, y después se liofilizó.

La ECM descelularizada se molió para formar un polvo seco, con la excepción de ECM de cerebro y tejido adiposo descelularizada. La ECM se digirió después para formar una forma disuelta usada como revestimiento, usando

pepsina en condiciones de baja acidez y después se diluyó usando ácido acético 0,1 M para llevarla a la concentración deseada de 1 mg/ml. Se usó electroforesis vertical en geles de poli(acrilamida) y se demostró una mezcla compleja de fragmentos peptídicos en cada tipo de tejido, que varió de un tejido a otro. Esto demuestra que existen componentes específicos de tejido en la ECM descelularizada.

- 5 Estos revestimientos se pueden aplicar a superficies de la misma manera que los revestimientos típicos de una sola proteína. Cultivando células en revestimientos específicos de tejidos que imitan el microambiente de la matriz extracelular *in vivo*, hubo un mejor control de la supervivencia y morfología celular, y diferenciación aumentada.

- 10 Se cultivaron neuronas corticales de rata en matriz cerebral y se compararon con un revestimiento estándar de poli-lisina. Las neuronas corticales de rata sobrevivieron y conservaron su morfología ramificada más tiempo en un revestimiento de matriz cerebral en comparación con el revestimiento estándar. También se observó una mayor diferenciación porcentual y mayor anchura de miotubo cuando se cultivaron mioblastos esqueléticos en un revestimiento de matriz de músculo esquelético en comparación con el revestimiento estándar de colágeno. Finalmente, los cardiomiocitos derivados de células madre embrionarias humanas mostraron mayor organización y maduración, incluyendo la formación de uniones célula-célula cuando se sembraron en placas sobre un
15 revestimiento de matriz cardíaca en comparación con el típico revestimiento de gelatina.

Estos estudios indican la importancia de usar imitadores de matriz extracelular para cultivo celular, con implicaciones para muchos estudios celulares *in vitro*, que incluyen la promoción de la maduración y diferenciación de células madre.

Ejemplo 10

- 20 En este caso, se investiga el uso del gel que se describe en la presente memoria en donde el gel se prepara a partir de ECM nativa de músculo esquelético descelularizado. Tales ECM no están de acuerdo con la invención. El gel puede actuar como un almacén de gelificación *in situ*, proporcionando una matriz natural de músculo esquelético para mejorar la regeneración de tejido en un modelo de lesión de pierna. La ventaja es que la ECM de músculo esquelético tiene componentes similares a la matriz hallada *in vivo*, y puede proporcionar una plataforma adecuada para la ingeniería y regeneración de tejidos, incorporación de células, y administración celular.
25

- 30 Se descelularizó músculo esquelético de porcino. El tejido se cortó en rodajas para ser de ~2 mm de espesor y se enjuagó con agua desionizada, después se agitó en dodecilsulfato sódico (SDS) al 1% en PBS hasta descelularizar. El tejido descelularizado se enjuagó después en agua desionizada para asegurar la separación de los detergentes. Se seccionaron trozos de tejido descelularizado y se tiñeron usando hematoxilina y eosina para asegurar la separación de las células. El tejido descelularizado se liofilizó después y se molió para formar un polvo fino.

- 35 La ECM de músculo esquelético se digirió después en pepsina en condiciones de baja acidez, y luego se neutralizó a pH fisiológico o casi fisiológico a través de la adición de hidróxido sódico y 10X PBS. La disolución neutralizada de ECM de músculo esquelético se diluyó después con PBS a la concentración deseada de 6 mg/ml y se dejó gelificar en placas de 96 pocillos a 37°C. La gelificación satisfactoria se confirmó mediante inspección visual del material.

- 40 ECM nativa de músculo esquelético disuelta a una concentración de 6 mg/ml se inyectó satisfactoriamente a través de una aguja de 25G en músculo femoral de pata de rata creando un almacén gelificado. La gelificación se produjo en 10-15 minutos. Se extirpó el músculo y la ECM y se seccionó y tiñó usando hematoxilina y eosina para confirmar la gelificación satisfactoria de la ECM de músculo esquelético en el músculo.

- También se puede usar ECM de músculo esquelético para suministrar células, tales como mioblastos esqueléticos u otros tipos de células relevantes de músculo en la ECM.
40

Realizaciones preferidas de la presente invención se han mostrado y descrito en la presente memoria.

REIVINDICACIONES

1. Una composición líquida que comprende matriz extracelular descelularizada derivada de tejido cardíaco, en donde la composición es adecuada para administración a través de un catéter de aguja sin obstruir el catéter, en donde la matriz extracelular descelularizada se puede obtener mediante un método que comprende:
- 5 (a) procesar una muestra de tejido cardíaco que tiene un componente de matriz extracelular y un componente de matriz no extracelular para separar el componente de matriz no extracelular para obtener matriz extracelular descelularizada;
- (b) liofilizar y pulverizar la matriz extracelular descelularizada en un polvo;
- (c) producir una composición que comprende el polvo de matriz extracelular descelularizada en un líquido;
- 10 (d) digerir la matriz extracelular descelularizada en la composición de la etapa (c) con una enzima degradadora de la matriz a pH 1-6; y
- (e) neutralizar el pH de la matriz extracelular descelularizada digerida de la etapa (d) para producir la composición líquida;
- en donde la composición líquida se convierte en un gel a temperatura corporal.
- 15 2. La composición de la reivindicación 1, en donde dicha composición líquida comprende además células.
3. La composición de la reivindicación 2, en donde las células son exógenas y seleccionadas o derivadas del grupo que consiste en células madre pluripotentes inducidas, cardiomiocitos, células progenitoras cardíacas, mioblastos, células esqueléticas, fibroblastos, células endoteliales y células madre embrionarias no humanas.
4. La composición de la reivindicación 1, en donde dicha composición comprende además un polímero sintético o de origen natural.
- 20 5. La composición de la reivindicación 1, en donde dicha composición comprende además un agente terapéutico exógeno.
6. La composición de la reivindicación 1, en donde la composición líquida es una disolución neutralizada.
7. La composición de la reivindicación 1, en donde la aguja del catéter es de calibre 27 o superior.
- 25 8. La composición de la reivindicación 1, en donde la concentración de matriz extracelular en la composición líquida está entre 1 y 20 mg/ml.
9. Un método para producir una composición que comprende polvo de matriz extracelular descelularizada derivada de tejido cardíaco, que comprende:
- 30 (a) procesar una muestra de tejido cardíaco que tiene un componente de matriz extracelular y un componente de matriz no extracelular con dodecilsulfato sódico para separar el componente de matriz no extracelular para obtener matriz extracelular descelularizada;
- (b) liofilizar y pulverizar la matriz extracelular descelularizada en un polvo;
- (c) producir una composición que comprende el polvo de matriz extracelular descelularizada en un líquido;
- 35 (d) digerir la matriz extracelular descelularizada en la composición de la etapa (c) con una enzima degradadora de la matriz a pH 1-6; y
- (e) neutralizar el pH de la matriz extracelular descelularizada digerida de la etapa (d).
10. El método de la reivindicación 9, que comprende además una etapa de producir una composición líquida que comprende el polvo de matriz extracelular descelularizada.
11. El método de la reivindicación 10, que comprende además una etapa de ajustar el pH de la composición líquida.
- 40 12. El método de la reivindicación 10, en donde dicha composición líquida se convierte en una forma de gel tras la administración.
13. El método de la reivindicación 10, que comprende además una etapa de ajustar la temperatura de la composición líquida.

14. Una composición líquida como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para uso en terapia.

15. Una composición líquida como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para usar en el tratamiento de la arritmia, infarto de miocardio, u otro tejido cardíaco defectuoso, enfermo, dañado o isquémico.

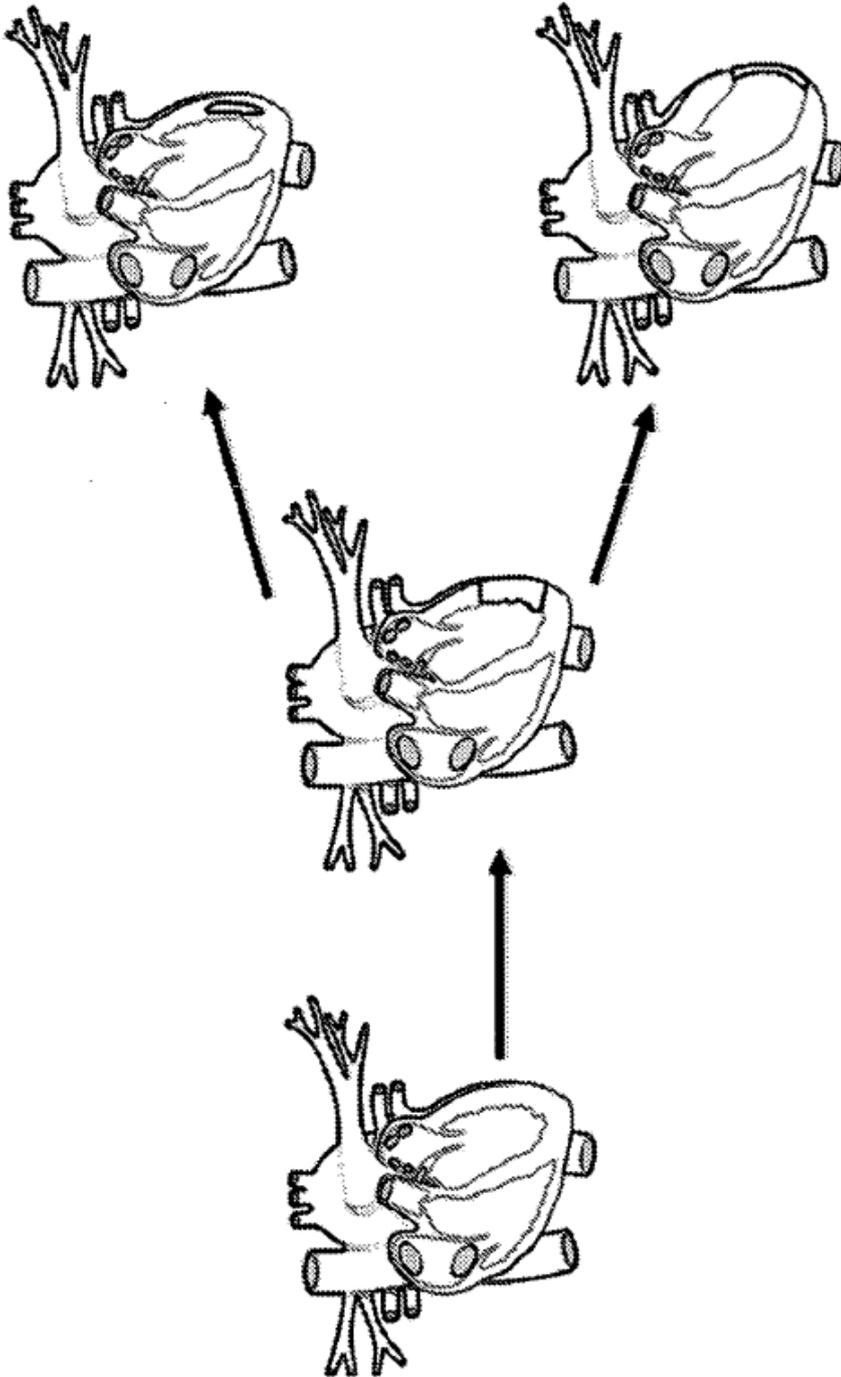


Figura 1

Area Miofibrilar Media de Cardiomiocitos

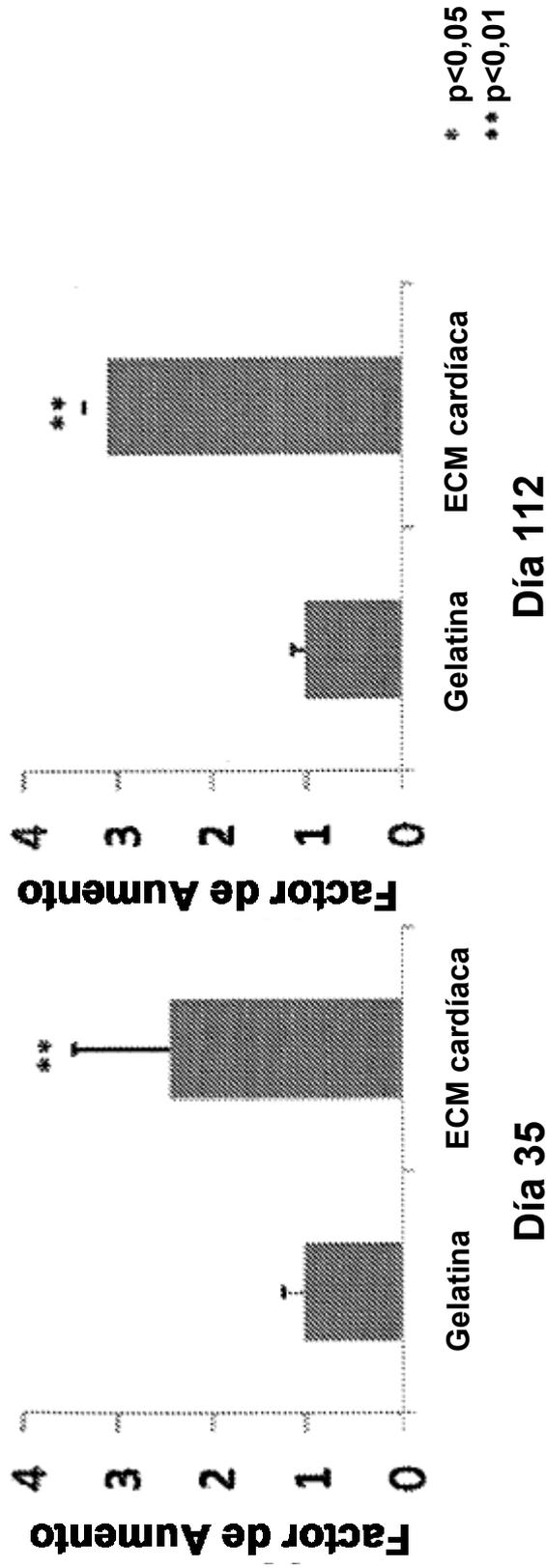


Figura 2

Número Promedio de Cardiomiocitos

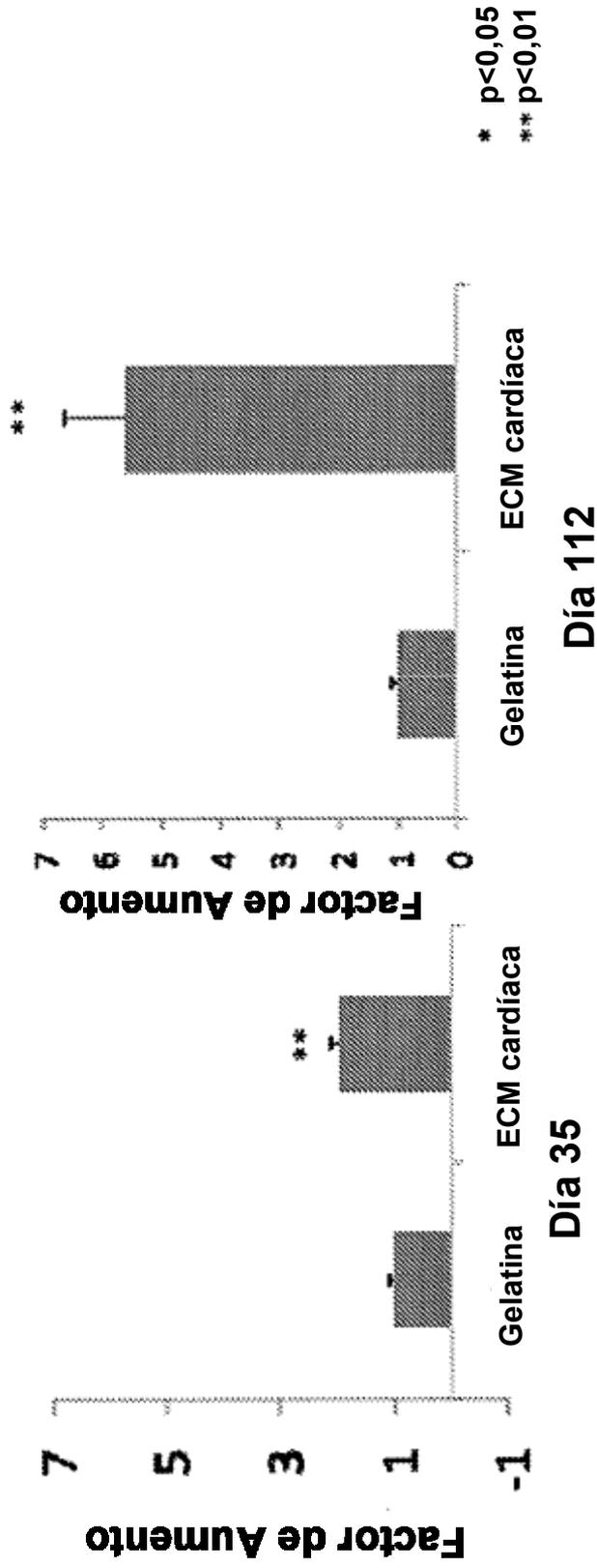


Figura 3

Desmosomas Organizados

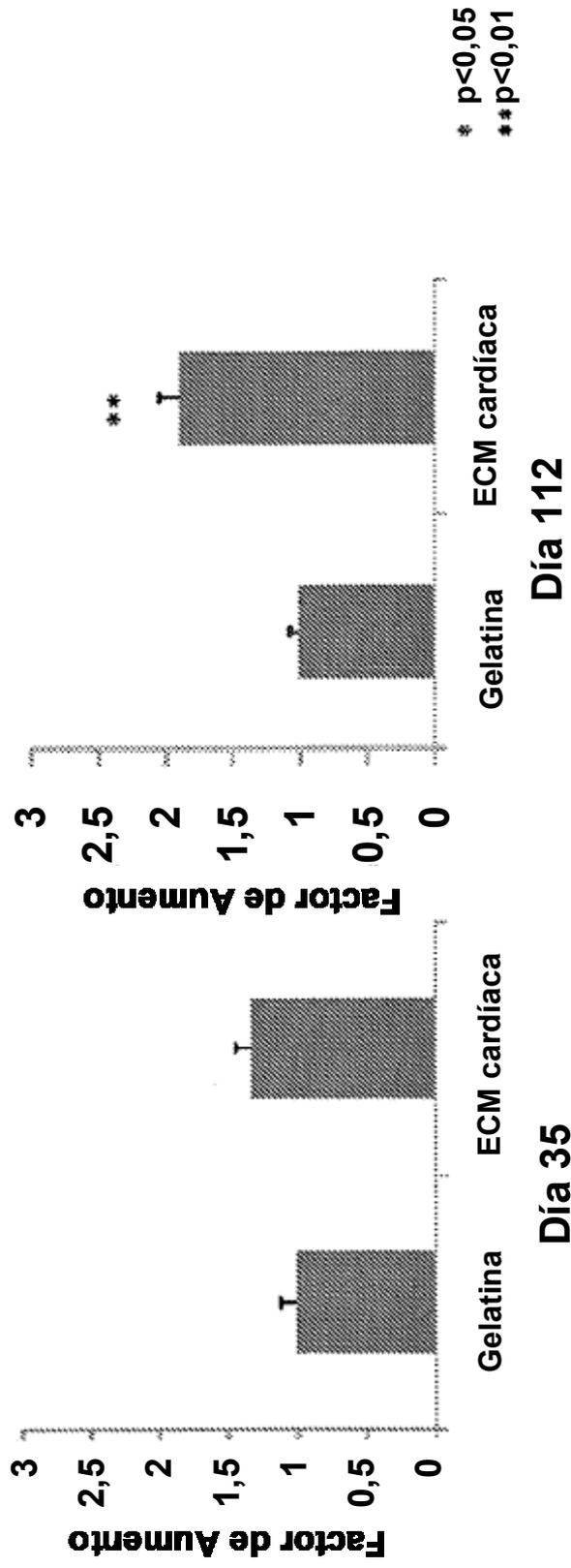
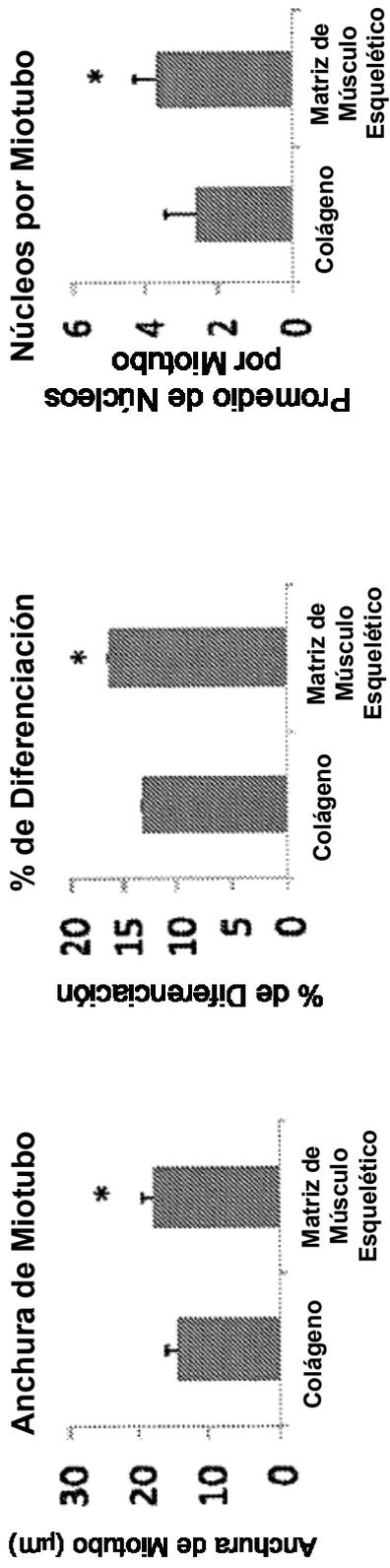


Figura 4

Mioblastos Esqueléticos Cultivados en Matriz de Músculo Esquelético



ES 2 628 100 T3

Figura 5

Los Mioblastos Esqueléticos Migran Específicamente hacia la Matriz de Músculo Esquelético

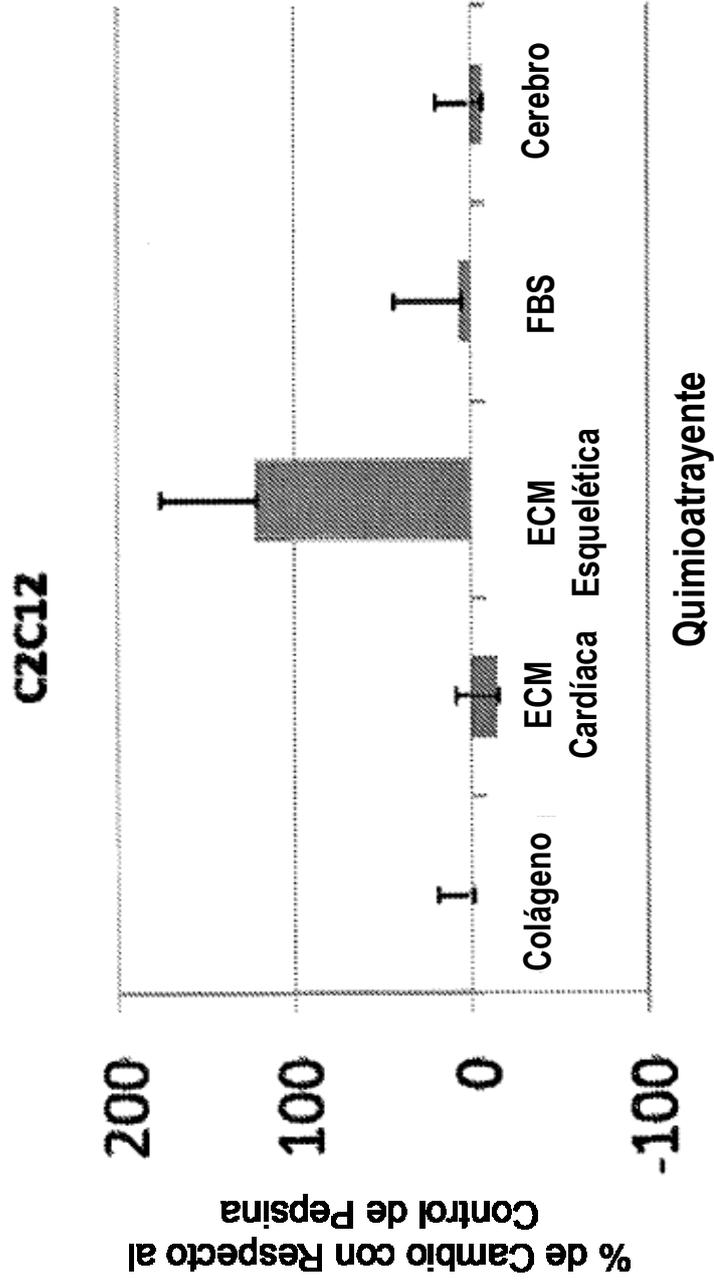


Figura 6