

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 785**

51 Int. Cl.:

A61L 27/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.04.2014 PCT/US2014/033365**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.10.2014 WO14168964**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2014 E 14783373 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2018 EP 2983616**

54 Título: **Método y composición para tratar una enfermedad inflamatoria intestinal sin colectomía**

30 Prioridad:

08.04.2013 US 201361809606 P
05.07.2013 US 201361843286 P
07.11.2013 US 201361901237 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.03.2019

73 Titular/es:

REGENTYS CORPORATION (50.0%)
6135 NW 167th Street, Suite E-15
Miami Lakes, FL 33015, US y
UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE
COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER
EDUCATION (50.0%)

72 Inventor/es:

RAMER, MARC;
BADYLAK, STEPHEN, F. y
KEANE, TIMOTHY

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

ES 2 703 785 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

Método y composición para tratar una enfermedad inflamatoria intestinal sin colectomía

5 Antecedentes

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) consiste en dos enfermedades independientes: la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU), que afectan a 833.000 estadounidenses.

10 Si bien la EC puede manifestarse en cualquier parte del tracto digestivo (de la boca al ano) y a menudo afecta a todo el grosor de la pared del tracto digestivo, la CU está confinada al colon y al recto y afecta sólo a la mucosa (revestimiento interno) de la pared.

15 Los tratamientos médicos, incluyendo el uso de antiinflamatorios que pueden tener efectos secundarios graves, pueden fallar en el tratamiento de los síntomas de la CU, y la extirpación completa del colon (colectomía) es la única "cura" conocida para la CU cuando el paciente no responde a todos los demás tratamientos médicos. La colectomía es una cirugía mayor pero bien establecida, que a menudo requiere una ileostomía para facilitar la eliminación de desechos.

20 Se necesitan alternativas a las primeras líneas de tratamiento (medicamentos con efectos secundarios potencialmente dañinos) y a las segundas líneas de tratamiento (colectomía) para tratar y curar la EII, incluida la CU.

25 La tendencia hacia procedimientos quirúrgicos mínimamente invasivos ha impulsado el desarrollo de armazones artificiales útiles para la regeneración de tejidos. El colágeno purificado, la gelatina, la grasa autóloga, el ácido hialurónico y los materiales sintéticos se han utilizado clínicamente como armazones inyectables en la medicina regenerativa para el tratamiento de la incontinencia urinaria, la enfermedad de reflujo, las patologías laríngeas y los cardiomiocitos neonatales. Sin embargo, los materiales demasiado purificados, químicamente modificados o sintéticos pueden provocar respuestas inmunitarias adversas por parte del huésped y limitar la migración celular a la matriz.

30 Los armazones derivados de la matriz extracelular (MEC) de origen natural poseen muchas propiedades bioactivas y se han utilizado para la reparación de una variedad de tejidos, incluidas las estructuras del tracto urinario inferior, el esófago, el tejido cardíaco y las estructuras músculo-tendinosas. Sin embargo, muchos de estos armazones se derivan de tejido no humano, y ninguno ha sido descrito para su uso en el tratamiento o regeneración del tejido del intestino inferior, como el tejido del colon, y tampoco específicamente para el tratamiento de la CU.

Sumario de la invención

40 El alcance de la invención está definido por las reivindicaciones. Cualquier referencia en la descripción a los métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, las composiciones farmacéuticas y los medicamentos de la presente invención para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia.

45 El método de la invención como se define en la reivindicación 1 comprende el tratamiento de tejido intestinal inferior dañado o enfermo mediante etapas que consisten en (1) realizar opcionalmente una mucosectomía en el revestimiento mucoso enfermo o dañado del colon, y (2) sembrar el revestimiento mucoso del colon con células madre o progenitoras, o estimular la migración de células madre y progenitoras al tejido del colon enfermo o dañado en un paciente que tiene síntomas de, o que padece de, enfermedad o daño en el revestimiento mucoso del colon. Una enfermedad del revestimiento mucoso del colon puede ser la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), y el método se puede utilizar para tratar, mejorar o curar la EII.

50 En una realización de la invención, las células madre o las células progenitoras pueden ser estimuladas en el sitio del tejido del colon dañado o enfermo introduciendo sobre, o en contacto con, la pared luminal del colon, una composición de matriz extracelular (MEC), p. ej., un injerto o armazón de MEC, en forma de un sólido (lámina o tubo) o fluido (solución, suspensión o gel).

55 En otra realización de la invención, células madre o células progenitoras pueden ser incorporadas a la composición de MEC sólida o fluida, y la composición de MEC que comprende células madre o células progenitoras puede ser suministradas al revestimiento mucoso del colon por medios de suministro apropiados para la composición que se describe en la presente memoria. Por ejemplo, una MEC sólida se puede implantar endoscópicamente en el revestimiento del colon, o una MEC líquida se puede infundir, inyectar o rociar en el colon.

60 Una vez sembradas o migradas al sitio del tejido dañado del colon, las células madre o células progenitoras se especializan, desarrollan *in situ* y reemplazan el revestimiento de la mucosa del colon. El método puede incluir además una o más etapas adicionales que consisten en: (3) realizar una ileostomía, y (4) proporcionar nutrición parenteral total (NPT) al paciente alimentándolo por vía intravenosa, evitando el tracto digestivo mientras se forma la nueva mucosa y se reemplaza el revestimiento de la mucosa enferma.

Cuando se emplea como parte del método de la invención, la etapa de la mucosectomía, que elimina el tejido enfermo o dañado antes del implante, el trasplante o la administración del injerto, puede llevarse a cabo mediante resección o ablación de tejidos.

- 5 Los métodos de resección o ablación incluyen la resección endoscópica o quirúrgica de la mucosa (escisión), la terapia endoscópica con láser, la terapia fotodinámica, la termocoagulación endoscópica mediante coagulación con plasma de argón, la ablación por radiofrecuencia, la crioblación o el uso de EDTA u otros agentes ablativos como la solución salina, preferentemente calentada. Estos procedimientos de mucosectomía están bien documentados en la técnica. Cualquiera de una o más de las técnicas o procedimientos anteriores pueden utilizarse en un método de la invención en cuestión en el que se emplee una etapa de resección o ablación.

15 En una realización, la composición del injerto de tejido puede ser un almacén de MEC formado como una lámina sólida o tubo sólido que puede ser colocado o asegurado en la mucosa del colon. Un almacén de lámina sólida o tubo sólido puede ser implantado o trasplantado o, como se reconoce en la técnica, colocado, aplicado o fijado, en un sitio deseado en un paciente por medios mecánicos o quirúrgicos, incluyendo, pero no limitado a, suturas, grapas, prótesis endovasculares o clips, o puede ser adherido a la mucosa por un adhesivo aceptable, tal como un adhesivo farmacéutica o terapéuticamente aceptable, incluyendo un bioadhesivo. Un procedimiento preferido para administrar una composición de MEC al colon puede emplear un endoscopio, que puede minimizar ventajosamente los procedimientos quirúrgicos invasivos.

20 Alternativamente, la MEC puede estar en forma de polvo o ser digerida, y solubilizada o suspendida para su presentación en forma de un fluido, como un gel, solución o suspensión. Una composición fluida puede de manera ventajosa ser administrada por medio de una inyección, infusión, pulverización, o similares, del gel, solución o suspensión al sitio que se va a tratar. Por ejemplo, una MEC fluidizada puede administrarse o aplicarse mediante inyección, infusión o pulverizado en el lumen del colon, p. ej., como terapia de enema mediante la cual la MEC fluida recubre el revestimiento mucoso del colon o, en el caso del colon mucosectomizado, recubre la pared expuesta del lumen del colon. Dicha administración puede repetirse varias veces, incluyendo una o más veces al día durante un periodo de varios días, semanas o meses, hasta aproximadamente un año, según lo determine el médico responsable del tratamiento, que supervisa la recurrencia del crecimiento o reemplazo aceptable de tejido viable o sano, según se desee.

35 Una realización preferida de un gel, solución o suspensión rociable de una MEC fluidizada es dispersar en forma de aerosol la composición para administración por pulverización. El pulverizador aerosolizado puede ser bombeado desde un reservorio fuente, a través de una cánula u otro conducto provisto en o de un endoscopio fabricado o modificado para entregar dicha MEC fluidizada al sitio o ubicación deseada.

40 Ventajosamente, se sabe que las células madre o las células progenitoras migran al sitio de la colocación o administración de la MEC y, con el tiempo, pueden reemplazar el tejido con células y tejidos sanos o no sintomáticos que tienen las propiedades y funciones normales de esas células o tejidos. Así, las realizaciones alternativas de una composición de la invención incluyen un almacén de tubo o lámina de MEC sólida, un almacén de MEC sólida recubierta o embebida con células madre o progenitoras; solo una MEC fluidizada (p. ej., gel); o un almacén de MEC sólida que comprende adicionalmente MEC fluidizada, con células madre o progenitoras recubierta, embebida, o mezclada con la MEC sólida o fluida.

45 También se entendería que la composición de MEC pueda ser un híbrido, derivado en parte del tejido natural y mezclado o combinado con un polímero sintético o natural. Es preferible, pero no imprescindible que un polímero biodegradable sea utilizado en una composición de MEC de la invención que comprende un polímero sintético o natural.

50 En otra realización de la invención, p. ej., una composición de MEC de lámina sólida o tubo sólido, puede ser formada o producida por uso de tecnología de impresión tridimensional (3-D).

55 La composición puede incluir además un aditivo para efectuar una propiedad deseada particular en la MEC. Por ejemplo, la composición de MEC puede incluir uno o más fármacos o productos biológicos, tales como antibiótico, antiinflamatorio, inmunosupresor, anticuerpo monoclonal, factor de crecimiento, o similares, que proporcionan una actividad deseada del fármaco o producto biológico añadido. Estos aditivos pueden hacer que el ambiente local conduzca a una remodelación favorable de los tejidos. Otros aditivos para la composición pueden incluir, por ejemplo, un agente potenciador de la viscosidad, o un agente que puede iniciar la formación de gel. Es generalmente aceptado en la técnica que la viscosidad más alta de un gel puede proporcionar propiedades de adhesión mejoradas del gel. Por consiguiente, un agente potenciador de la viscosidad también puede servir para facilitar la adhesión. Los facilitadores adhesivos son bien conocidos en la técnica, pero pueden incluir además componentes de sangre, tales como coagulantes de sangre o factores de coagulación de sangre, como un agente potenciador de la viscosidad o un agente potenciador de la adhesión.

65 También se incluye como parte de la invención un método para tratar tejido de colon enfermo o dañado utilizando un injerto o almacén de MEC como se describe en la presente memoria, sin resección o ablación previa. Por ejemplo,

en los casos en que la enfermedad o el daño al tejido crea una lesión, tal como una superficie expuesta o sangrante del tejido, puede omitirse la resección del tejido antes del implante, trasplante, aplicación o administración de la composición, armazón o injerto de MEC. Por consiguiente, una realización del método en cuestión comprende las etapas que consisten en:

- 5
- a) preparación de un armazón, injerto o composición de MEC utilizando un tejido seleccionado entre tejido intestinal, reproductivo, integumentario, pancreático, renal, circulatorio y respiratorio,
 - b) implante, trasplante, aplicación o administración de la composición, injerto o armazón de MEC en el tejido de un paciente que padezca una enfermedad o afección que afecte al tejido del tracto intestinal inferior en un
- 10 paciente que padezca una enfermedad, daño o afección que afecte al tejido intestinal, en el que el tejido intestinal no se someta a resección o ablación antes del implante, trasplante, aplicación o administración de la composición de MEC.

15 En una realización preferida, este método comprende el tratamiento del tejido del colon dañado o enfermo que presenta EII, tal como colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn; poliposis adenomatosa familiar; enfermedad de Hirschsprung; estenosis; proctitis; cánceres de colon; o fístula, y más preferentemente, el tratamiento de la enfermedad o el daño al tejido de la mucosa del colon.

20 Otra realización de la invención es un método para tratar tejido enfermo o dañado utilizando un armazón de MEC específico de tejido (MEC-ET) como se describe en la presente memoria, con o sin resección o ablación previa. Por consiguiente, una realización del método en cuestión comprende las etapas que consisten en:

- a. realizar opcionalmente una mucosectomía en el tejido dañado o enfermo;
 - b. preparar una composición, injerto o armazón de MEC-ET utilizando tejido seleccionado entre tejido intestinal, reproductivo (que no sea vaginal), integumentario, pancreático, renal, circulatorio y respiratorio,
 - c. implantar, trasplantar o administrar el armazón o la composición de MEC-ET en el tejido de un paciente que padece una enfermedad o afección que afecta al mismo tejido intestinal, reproductivo (que no sea vaginal), integumentario, pancreático, renal, circulatorio y respiratorio.
- 25

30 Se entiende que un injerto, armazón o composición de MEC o MEC-ET según la invención puede ser una matriz porosa, macroporosa o microporosa biocompatible, en la que se pueden dispersar células madre o gel, solución o suspensión de MEC. Además, una MEC o MEC-ET de la invención puede ser gelificada.

35 Métodos para preparar composiciones de MEC en tubo, lámina solubilizadas y gelificadas, útiles como matrices o armazones de crecimiento celular utilizados como injertos, se describen en el estado de la técnica. Las composiciones de MEC en gel pueden moldearse antes del implante o administrarse a un paciente en una forma no gelificada antes de la gelificación, en la que la composición se gelifica *in situ*. Estos y otros métodos de formación de injertos de MEC se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 8.361.503.

40 En una realización preferida, la composición de MEC en gel está preparada de acuerdo con uno o más procesos descritos. Por ejemplo, se puede preparar una MEC en gel mediante un método que comprende:

- i) triturar una MEC,
 - ii) solubilizar una MEC intacta, no dializada o no reticulada por digestión con una proteasa ácida en una solución ácida para producir una solución de digestión,
 - iii) ajustar el pH de la solución de digestión a un pH comprendido entre 7,2 y 7,8 para producir una solución de digestión neutralizada, y
 - iv) gelificar la solución a una temperatura superior a 25 °C.
- 45

50 En otra realización el método de preparación de un injerto o armazón o composición de MEC incluye además someter a ultrasonidos el armazón. Un método adicional de la invención comprende unir un armazón de MEC-ET a un tejido de un paciente en el que la superficie del armazón comprende una MEC solubilizada gelificada embebida o recubierta con las células de un paciente, p. ej., células madre, en las que las células embebidas o recubiertas cuentan con tiempo suficiente para un crecimiento interno de las células del paciente en el armazón antes de

55 implantar, trasplantar, o administrar el armazón al tejido.

Llevando a cabo un método de la invención, un armazón o un injerto se prepara como se describe en la presente memoria, u otro método conocido de preparación de MEC, que acto seguido se implanta, trasplanta, o administra a al menos una sección de tejido que está enfermo o dañado, y se deja que permanezca en contacto con el tejido enfermo o dañado durante un periodo de tiempo suficiente de modo que las células de reemplazo crezcan y reemplacen las células enfermas o dañadas. Un periodo de tiempo suficiente puede ser de un día hasta aproximadamente seis meses.

60

De manera ventajosa, el implante, el trasplante o la administración de un injerto de MEC proporciona un estímulo para la migración de las células madre al lugar del implante, trasplante o administración del injerto de MEC. Por ejemplo, en el tratamiento de la CU, se implanta, trasplanta o administra un injerto de MEC en contacto con al

65

menos una sección del colon en la que la mucosa del colon enferma o dañada estaba (en el caso de la postmucosectomía) o está (en el caso de que la mucosectomía no esté preformada), retenida en contacto con la mucosa durante un periodo de tiempo para permitir el crecimiento y el reemplazo de las células de la mucosa del colon, lo que resulta en el reemplazo de las células enfermas o dañadas con células sanas. El injerto de MEC puede ser proporcionado como un segmento sólido relativamente corto, del orden de 1-10 centímetros, implantado simultánea o secuencialmente, trasplantado o administrado a la pared interna del colon. Alternativamente, el injerto de MEC puede prepararse con una pluralidad de secciones o longitudes que corresponden a todo el colon.

Breve descripción de las figuras

La FIG. 1 muestra los resultados de una sección de colon (fotografía inferior) extraída de un perro tratado con matriz extracelular de una submucosa del intestino delgado (MEC-SID) como se describe en la presente memoria; las micrografías (fotografías superiores AD) muestran exámenes celulares microscópicos a lo largo del gradiente distal → proximal de la sección del colon que ilustra un aumento de la cobertura de la mucosa a lo largo del gradiente, es decir, se observa una cobertura incompleta de la mucosa en la anastomosis distal (A), y está presente un aumento de la cobertura de la mucosa hacia los extremos proximales (B), (C) y (D).

Descripción detallada de la invención

La invención en cuestión se refiere al tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), por ejemplo, colitis ulcerosa (CU) o enfermedad de Crohn (EC), o similares, reemplazando o estimulando el reemplazo de células de la mucosa enfermas o dañadas y tejido sin colectomía.

El método de la invención definido en la reivindicación 1, comprende tratar el tejido intestinal inferior dañado o enfermo mediante las etapas que consisten en (1) realizar opcionalmente una mucosectomía en el revestimiento mucoso enfermo o dañado del colon, y (2) sembrar el revestimiento mucoso del colon con células madre o células progenitoras, o estimular la migración de células madre y progenitoras al tejido del colon enfermo o dañado en un paciente que presenta síntomas de, o padece, una enfermedad o daño en el revestimiento de la mucosa del colon. Una enfermedad del revestimiento de la mucosa del colon puede ser una enfermedad inflamatoria intestinal (EII), y el método puede utilizarse para tratar, mejorar o curar la EII.

En una realización de la invención, las células madre o las células progenitoras pueden ser estimuladas en el sitio del tejido del colon dañado o enfermo introduciendo sobre, o en contacto con, la pared luminal del colon una composición de matriz extracelular (MEC), p. ej., un injerto o armazón de MEC, en forma de un sólido (lámina o tubo) o fluido (solución, suspensión o gel).

En otra realización de la invención, pueden incorporarse células madre o células progenitoras en la composición de MEC sólida o fluida, y la composición de IMEC que comprende células madre o células progenitoras puede suministrarse al revestimiento de la mucosa del colon por un medio de administración apropiado para la composición descrita en la presente memoria. Por ejemplo, una MEC sólida se puede implantar endoscópicamente en el revestimiento del colon, o una MEC fluida se puede infundir, inyectar o rociar en el colon.

Por diseño, la MEC se descompone rápidamente *in situ* y fomenta una respuesta inflamatoria, incluida la migración de macrófagos al sitio. Una característica única de la MEC es fomentar un cambio en el fenotipo de estos macrófagos del tipo M1 (proinflamatorio, como se vería en un paciente que padece CU) al tipo M2 (remodelación pro-tejido, como se vería en una persona sin una afección pro-inflamatoria subyacente). Una ramificación importante de este cambio de fenotipo M1 a M2 es permitir que el tejido que, de otro modo, está predispuesto a la inflamación, permanezca sano.

La etapa de mucosectomía opcional, que se lleva a cabo para extirpar tejido enfermo o dañado, p. ej., tejido de la mucosa del colon, antes del implante, trasplante o administración de un injerto, se puede realizar mediante cualquier método comúnmente aceptado, como la resección o la ablación del tejido. Los métodos de resección o ablación conocidos incluyen resección endoscópica o quirúrgica de la mucosa (escisión), terapia endoscópica con láser, terapia fotodinámica, termocoagulación endoscópica mediante coagulación con plasma de argón, crioterapia, ablación por radiofrecuencia o ablación utilizando EDTA u otros agentes ablativos, tales como la solución salina calentada o "caliente" u otra solución acuosa.

Las células madre se introducen en un tejido mucosectomizado colocando y/o asegurando, p. ej., implantando, trasplantando o administrando material o composición de matriz extracelular (MEC) como un armazón o injerto de MEC, en el sitio. La introducción de una composición de MEC en el sitio mucosectomizado puede estar en forma de una lámina sólida o tubo sólido, o puede estar en forma de un fluido, tal como una solución, suspensión o gel. La colocación o fijación del material de MEC sólida puede realizarse mediante suturas, clips, grapas, pegamento u otros medios de fijación bien conocidos.

Alternativamente, una MEC fluidizada puede administrarse mediante un procedimiento de entrega o administración de fluidos comúnmente empleado, tal como inyección, infusión o empapado ("pulverización a chorro" en el sitio) o

rociado del fluido en el sitio. Una técnica de pulverización preferida se lleva a cabo utilizando un fluido de MEC en aerosol, suministrado, por ejemplo, endoscópicamente.

5 Como se utiliza en la presente memoria, los términos "composición", "material", "armazón" e "injerto", en referencia a MEC, se pueden utilizar de manera intercambiable, y no connotan una configuración particular, por estar en una forma sólida, líquida o fluida u otra forma. Por ejemplo, un "armazón de MEC" puede ser sólido o fluido.

10 Preferentemente, una composición de MEC fluidizada se forma como un gel de manera que tiene propiedades viscosas y tiene una viscosidad suficiente para que el fluido se autoadhiera a la ubicación deseada dentro del cuerpo. En una realización preferida, la MEC fluidizada es un hidrogel que tiene propiedades líquidas relativamente no viscosas cuando se aplica o administra, y que, de manera ventajosa, se espesa o se vuelve más viscosa, formando un gel adhesivo al contacto o poco después con el cuerpo, en el sitio de administración o aplicación. La gelificación puede iniciarse mediante un aumento de la temperatura, como el calor corporal posterior a la administración. La MEC fluida también se puede mezclar con un agente viscoso distinto, tal como un hidrogel u otro agente gelificante comúnmente conocido para proporcionar suficiente viscosidad. Alternativamente, pueden administrarse dos fluidos, por lo que al menos uno de los fluidos contiene material de MEC, y en el que los dos fluidos se gelifican cuando entran en contacto entre sí o cuando se mezclan.

20 Está bien establecido que una composición de MEC puede hacer que las células madre migren al sitio cuando existe suficiente vascularización del tejido, y los vasos sanguíneos proporcionan un conducto adecuado para que las células migren al sitio. Además, la MEC se comunica con el tejido adyacente o subyacente a través de la señalización química, y el tejido adyacente o subyacente se comunica con la MEC, mediante un fenómeno denominado "reciprocidad dinámica" que optimiza el reemplazo o la regeneración de células y tejidos en los que se utiliza la MEC. Por ende, la composición de MEC puede servir como un armazón sólido, líquido o en gel para el crecimiento de nuevos tejidos y células en el sitio de colocación, administración o aplicación.

30 En una realización adicional, una composición derivada de MEC puede ser un injerto de tejido por el que la composición de MEC sirve como un armazón para promover el nuevo crecimiento de tejido en el sitio del implante. El armazón puede ser un tubo o una lámina de MEC colocado en el sitio deseado. El armazón puede ser una matriz porosa, macroporosa o microporosa biocompatible, en la que se pueden dispersar células madre o gel, solución o suspensión de MEC. La MEC también puede gelificarse posteriormente después de la dispersión de las células madre o la solución o suspensión de MEC.

35 La MEC se deriva de la submucosa del intestino delgado (SID).

40 Como se utiliza en la presente memoria, los términos implantar o implante, trasplantar o trasplante, aplicar o aplicación, administrar o administración, infundir o infusión, inyectar o inyección, suministrar o suministro, se refieren al procedimiento o suministro de una MEC al sitio de tratamiento, y un experto en la materia entenderá que tiene el mismo significado, dependiendo de las propiedades de la composición y el procedimiento empleado para llevar a cabo el suministro de MEC al sitio. Estos términos se pueden utilizar indistintamente y de ninguna manera limitan el método de la invención.

45 Opcionalmente, cuando se trata el colon, el método puede incluir además una o más de las etapas adicionales: (3) realizar una ileostomía y (4) proporcionar nutrición parenteral total (NPT) al paciente alimentando al paciente por vía intravenosa mientras se forma una mucosa nueva.

50 En una realización preferida, este método comprende tratar tejido de colon dañado o enfermo. El método puede emplearse, por ejemplo, para tratar el daño o la enfermedad del tejido del colon resultante de la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, poliposis adenomatosa familiar, enfermedad de Hirschsprung; estenosis; proctitis; cánceres de colon; o fístula, y más preferentemente, el tratamiento de una enfermedad o daño en el tejido de la mucosa del colon.

55 Los métodos para preparar composiciones de MEC en tubos, láminas, solubilizadas y gelificadas, útiles como armazones de crecimiento celular, se describen en el estado de la técnica. Las composiciones de MEC en gel pueden moldearse antes del implante o administrarse a un paciente en forma no gelificada antes de la gelificación, en la que la composición se gelifica *in situ*.

60 Estos y otros métodos para formar injertos de MEC se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 8.361.503. En una realización preferida, una composición de MEC en gel se prepara de acuerdo con uno o más procedimientos como se describe. Por ejemplo, una MEC en gel se puede preparar por un método que comprende:

- i. triturar una MEC,
- ii. solubilizar una MEC intacta, no dializada o no reticulada mediante digestión con una proteasa ácida en una solución ácida para producir una solución de digestión,
- 65 iii. ajustar el pH de la solución de digestión a un pH entre 7,2 y 7,8 para producir una solución de digestión neutralizada, y

iv. gelificar la solución a una temperatura superior a 25 °C.

En otra realización, el método de preparación de un armazón de MEC incluye además someter a ultrasonidos el armazón.

5 Al llevar a cabo un método de la invención, se prepara un injerto o armazón de acuerdo con la descripción de la presente memoria, luego se implanta, trasplanta o se administra en al menos una sección de tejido enfermo o dañado, y se le permite permanecer en contacto con el tejido enfermo o dañado durante un periodo de tiempo suficiente para que las células de reemplazo crezcan y reemplacen a las células enfermas o dañadas.

10 Un periodo de tiempo suficiente puede ser de un día a unas pocas semanas o meses, dependiendo de la capacidad de respuesta del paciente a dicho método de tratamiento. Un periodo de un año de tratamiento sin una reconstrucción exitosa del tejido puede ser el límite superior para continuar dicho tratamiento. El material de MEC se biodegrada de forma natural en el cuerpo y no es necesario retirarlo.

15 Para llevar a cabo el método en cuestión que trata la CU, se implanta, trasplanta o se administra un injerto de MEC en contacto con al menos una sección del colon enfermo o dañado, se retiene en contacto con la mucosa durante un periodo de tiempo para permitir el crecimiento y reemplazo de las células de la mucosa del colon, lo que resulta en el reemplazo de las células enfermas o dañadas con células de la mucosa sanas que no exhiben inflamación u otras manifestaciones de células enfermas de la CU.

20 El injerto de MEC se puede proporcionar como un tubo o segmento de lámina relativamente corto, del orden de 1-10 centímetros de longitud, implantado, trasplantado o administrado a la pared interna del colon. Alternativamente, el injerto de MEC puede comprender una o más longitudes que corresponden a la longitud completa del colon. Se puede fijar una MEC de tubo sólido o lámina sólida al tejido a tratar mediante sutura, clips, grapas, pegamento o similares. Alternativamente, el tejido del colon puede tratarse administrando, p. ej., pulverizando, una solución líquida, suspensión o composición en gel en el sitio que se está tratando.

25 En un método de tratamiento de la CU que incluye una etapa de mucosectomía, se extrae el tejido que presenta los síntomas de la CU, ya que la CU está confinada dentro de la mucosa. La etapa de mucosectomía se puede realizar por endoscopia, obviando la necesidad de cirugía abierta o laparoscópica. La etapa de estimulación de células madre permite que se forme una mucosa nueva y sana en el lumen del colon. La mucosectomía se puede realizar en un segmento parcial o corto del colon o en longitudes más largas del colon.

30 Independientemente de que se lleve a cabo en un segmento del colon o en toda la longitud del colon, la invención en cuestión puede ofrecer beneficios que eliminan la necesidad de una colectomía abdominal y dejan un manguito de tejido rectal nativo, *in situ*, incluidos los beneficios de eliminar malignidad potencial existente en el recto debido a patologías proliferativas (malignas), p. ej., CU o poliposis familiar; y permitir que un profesional de la salud deje un segmento rectosigmoideo más largo en su lugar, con beneficios funcionales de:

- 35
- disminución del riesgo de alteración del esfínter (incontinencia) o daño del nervio sacro (impotencia) que acarrearán las disecciones más abajo, y
 - función mejorada del reservorio, lo que permite hábitos más normales del intestino debido a la mayor absorción de agua y mejor capacidad de almacenamiento;
 - 45 - ofrece una simplicidad relativa y menos invasividad que la colectomía o procedimientos similares, tales como IPAA (proctocolectomía total con anastomosis ileoanal); una mucosectomía es un procedimiento bastante sencillo que puede realizarse desde abajo al mismo tiempo que la resección de arrastre/ileostomía o en cualquier momento posterior. Las células madre podrían ser "cultivadas" y regenerar la mucosa, mientras que la ileostomía de desviación aún está presente;
 - 50 - al sólo reducir el colon se evitan las preocupaciones de por vida de vivir sin colon (p. ej., pouchitis, obstrucción intestinal, deshidratación, etc.);
 - crea solo una ileostomía temporal (es decir, hasta que la nueva mucosa sea viable); y
 - reúne varias disciplinas (quirúrgica, médica, endoscópica e ingeniería de tejidos) que de otro modo podrían funcionar de manera independiente para tratar la EII.

55 Queda entendido que se puedan utilizar varios métodos y procedimientos para entregar células madre al colon, p. ej., en un armazón, en un caldo de cultivo administrado a través de enema, por un sistema de administración basado en catéter, o similares. Ventajosamente, el material de MEC se puede aplicar durante el mismo procedimiento quirúrgico al mismo tiempo que cuando se crea la ileostomía, y se puede permitir que la mucosa proliferen o regenere mientras la bolsa interna cicatriza.

Ejemplo 1 - Colocación quirúrgica de MEC sólida para reemplazo de tejido de colon

65 Los injertos de matriz extracelular de una submucosa del intestino delgado (MEC-SID) se injertaron en el tejido del colon de cuatro (4) perros vivos. Los injertos de MEC-SID de aproximadamente 3-4 centímetros de longitud se prepararon de acuerdo con técnicas conocidas. Los injertos se prepararon con diferentes números de capas -

láminas o tubos de 2 capas, 4 capas, 6 capas y 8 capas y se analizaron después de la resección de la mucosa circunferencial transanal.

5 Cuatro (4) perras mestizas adultas sanas (de aproximadamente 20 kg de peso) fueron sometidas a MER de la mucosa circunferencial del colon. Con el perro bajo anestesia general, se realizó una mucosectomía quirúrgica. Alternativamente, la ablación del tejido de la mucosa, como la MER, se puede realizar, p. ej., con un endoscopio terapéutico (EG-3430, Pentax Medical, Montvale, NJ) y un kit disponible comercialmente (Kit MER, Olympus America, Center Valley, Pa). Las resecciones de la mucosa fragmentada se realizaron secuencialmente hasta que se completó una resección circunferencial de 4 cm.

10 Acto seguido se colocó endoscópicamente de manera quirúrgica un injerto o armazón de MEC tubular derivado de la submucosa de intestino delgado (SID) porcino en las cuatro perras. El material de armazón biológico MEC-SID se preparó como se ha descrito previamente y se configuró en una forma tubular. En resumen, se recogió SID porcino de cerdos con peso de mercado (aproximadamente 110-130 kg) inmediatamente después de la muerte. Los tejidos conectivos externos residuales, incluido el tejido adiposo, se cortaron y todo el material de desecho residual se eliminó mediante lavados repetidos con agua corriente. La capa de submucosa se deslaminó mecánicamente del tejido del intestino delgado. Luego, la capa de submucosa se descelularizó y desinfectó por inmersión en ácido(s) peracético(s) al 0,1 % (vol/vol), etanol al 4 % (vol/vol) y agua desionizada al 96 % (vol/vol) durante 2 horas.

15 El material de MEC-SID se lavó luego dos veces durante 15 minutos con una solución salina tamponada con fosfato (pH Z 7,4) y dos veces durante 15 minutos con agua desionizada. Los armazones tubulares fueron fabricados para que coincidan con la anatomía del colon canino. Brevemente, los tubos multicapa se crearon envolviendo láminas hidratadas de SID alrededor de un tubo/mandril perforado de 22 mm que se cubrió con cinta umbilical con un total de varias revoluciones completas (es decir, un tubo multicapa). Las construcciones se colocaron luego en bolsas de plástico y se unieron a una bomba de vacío (modelo D4B, Leybold, Export, PA) con una trampa de condensado en línea.

20 Las construcciones se sometieron a un vacío de 710 a 740 mm Hg durante 10 a 12 horas para eliminar el agua y formar una construcción multilaminada estrechamente acoplada. Después de que cada dispositivo MEC se retire del mandril, se esterilizó finalmente con óxido de etileno.

25 Para la colocación endoscópica del injerto MEC-SID, el armazón tubular se hidrató en un baño de solución salina durante 5 minutos y luego se colocó sobre un balón de acalasia de 30 mm (globo de acalasia por endoscopia de Cook, Wilson-Cook Medical, Winston-Salem, NC). El dispositivo de MEC-SID se cerró con dos suturas de seda 4-0 con nudos de cirujano que se soltarían cuando se inflase el globo. Un alambre de 0,035 pulgadas (Jagwire, Boston Scientific, Natick, MA) fue colocado endoscópicamente en el colon del perro. Luego, se pasó el globo por el alambre y se colocó bajo guía endoscópica con el MEC-SID estableciendo la longitud de la resección de la mucosa.

30 A continuación, se inyectó un ml de un adhesivo quirúrgico de uretano derivado de lisina (UDL) degradable (TissuGlu, Cohera Medical, Pittsburgh, Pa) a través de un catéter guía endoscópico 6F (sistema de introducción de prótesis endovascular Oasis, Wilson-Cook Medical) entre la pared de colon y la MEC-SID en 2 tiras separadas en lados opuestos del dispositivo para evitar el deslizamiento. El globo fue inflado manualmente hasta su máxima capacidad, expandiendo el armazón contra la pared del colon. El inflado del globo se mantuvo durante 15 minutos antes del desinflado y la retirada, dejando el armazón MEC-SID en su lugar dentro del colon.

35 Después de la operación, las perras se recuperaron de la anestesia, se extubaron y se monitorizaron en la sala de recuperación hasta que estuvieron descansando cómodamente en una posición esternal. Las perras se mantuvieron en una jaula durante la noche y se devolvieron a su alojamiento de mayor tamaño en el día 1 del postoperatorio. Todas las perras recibieron antibióticos profilácticos orales que consisten en cefalotina/cefalexina (35 mg/kg) dos veces al día durante 7 a 9 días.

40 Se administró acepromazina intravenosa (0,1 mg/kg) y butorfanol (0,05 mg/kg) durante 2 días, seguido de buprenorfina subcutánea o intramuscular (0,01 a 0,02 mg/kg) cada 12 horas, según fuera necesario para la analgesia.

45 Todos los perros también recibieron 20 mg al día de omeprazol. La ingesta oral comenzó 36 horas después de la cirugía. Los perros fueron alimentados desde una plataforma elevada/levantada. Los requisitos nutricionales diarios fueron calculados y divididos en 3 alimentaciones separadas. La comida en forma de gachas/blanda se proporcionó durante 1 semana después de la operación, seguido de un cambio gradual a la comida sólida durante el siguiente periodo de 2 semanas. Las perras se pesaron semanalmente y se alojaron en una sección de aproximadamente 304,8 a 426,72 cm para permitir la libertad de deambular.

50 Los exámenes endoscópicos se realizaron 1 mes después de la operación e inmediatamente antes de la eutanasia a las 12 semanas para evaluar la apariencia y la estenosis de la mucosa del colon.

55 Inmediatamente después de la eutanasia, se recolectaron el sitio de colocación del armazón y el tejido del colon

nativo proximal y distal al sitio de colocación del armazón. El segmento extirpado se dividió longitudinalmente y la superficie de la mucosa expuesta se examinó y fotografió para realizar mediciones dimensionales. La circunferencia luminal del colon se midió 3 cm proximal al borde superior del sitio remodelado y en la mitad del injerto para determinar la extensión de la estenosis. Los resultados se expresaron como porcentaje de reducción de la circunferencia entre el sitio remodelado y el tejido normal proximal (media +/- DT).

El tejido extirpado se fijó a un panel de corcho en una posición aplanada y se sumergió en formalina tamponada neutra al 10 %. El espécimen se cortó longitudinalmente e incluyó tejido normal y remodelado, se seccionó y se tiñó con hematoxilina-eosina y tinciones tricrómicas de Masson. Las áreas examinadas incluyeron el tejido nativo, las interfaces proximal y distal entre el área remodelada y el tejido nativo, y la región media del área remodelada. Sobre la base del examen de las distribuciones de datos, los datos parecen estar distribuidos normalmente. Por lo tanto, el enfoque estadístico utilizado para comparar los resultados fue el ensayo t paramétrico (n = 4).

La hipótesis probada fue que el tratamiento del defecto MER con MEC-SID causaría menos reducción en la circunferencia en comparación con ningún tratamiento. Se reconoce que los datos de animales de ensayo individuales se sometieron a múltiples análisis estadísticos (es decir, reducción de la circunferencia y peso). La comparación de la reducción de la circunferencia luminal en las perras se tomó como el análisis estadístico primario, que no implicó ensayos múltiples. Todos los demás ensayos estadísticos se consideran secundarios, con sus valores de P declarados sin corregir para mediciones repetidas y deben tomarse como descriptivos solamente.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES.

En ausencia de tratamiento, la formación de cicatrices y estenosis es el resultado esperado. Sin embargo, el tratamiento con MEC dio como resultado una cobertura de la mucosa del tejido reseccionado que parecía a simple vista y microscópicamente normal. Los resultados variaron ligeramente en función del número de capas de MEC en el dispositivo tubular: un mayor número de capas de MEC se asoció generalmente con una mayor cobertura de la mucosa. No hubo signos de estenosis en ninguna perra tratada con un armazón de MEC.

El estudio actual en un modelo de perro mostró que un armazón de MEC-SID, desplegado endoscópicamente después de la MER circunferencial, facilitó la remodelación de la mucosa del colon (FIG. 1) sin formación de estenosis. El tejido remodelado consistía en un lumen completamente epitelializado con una submucosa colágena densa y organizada y una capa muscular externa de apariencia normal.

Por consiguiente, estos estudios que utilizan un modelo de perro y emplean injertos de MEC-SID para la regeneración del tejido del revestimiento de la mucosa del colon demuestran que la MEC se puede utilizar para tratar la EII, tales como la CU o EC.

Habiendo descrito así la invención, está claro que lo que puedan parecer diferentes realizaciones podría proporcionarse sin apartarse del espíritu y alcance de la invención. Por ende, se pretende que la memoria descriptiva anterior se interprete como ilustrativa en lugar de en un sentido limitativo.

Ejemplo 2 - Aplicación de MEC en gel para reemplazo de tejido de colon

De acuerdo con la invención, la viabilidad de utilizar una composición de gel de MEC para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) se puede ensayar *in vivo* en ratas. Las ratas pueden establecerse como un modelo para la EII humana, como la colitis ulcerosa (CU), por lo que la CU puede inducirse en el tejido del colon de rata mediante la administración de dextrano sulfato de sodio (DSS) en agua potable ad libitum durante varios días.

La CU aguda puede inducirse en ratas administrando, en agua potable proporcionada ad libitum, 2 % de DSS durante siete días, seguido de un lavado con solución salina. La CU crónica se puede inducir en ratas administrando, en agua potable proporcionada ad libitum, 2 % de DSS durante uno o más periodos consecutivos de 7 días, seguido de la administración de agua regular.

El tratamiento de la CU puede llevarse a cabo utilizando una matriz extracelular (MEC) en gel derivada de la submucosa del intestino delgado (SID) e introducida en el colon mediante enema. La MEC-SID en gel se puede administrar una o más veces al día durante un periodo de al menos una semana, y preferentemente hasta aproximadamente un mes. Un régimen de dosificación preferido para MEC-SID es una vez al día durante 30 días.

Método de preparación de geles de MEC

La preparación de SID a partir de un segmento del intestino delgado se detalla en la patente de Estados Unidos n.º 4.902.508, patente de Estados Unidos n.º 5.275.826, y la patente de Estados Unidos n.º 5.514.533. Un segmento del intestino se somete primero a abrasión mediante un movimiento de limpieza longitudinal para eliminar las capas externas (en particular la túnica serosa y la túnica muscularis) y las capas internas (las porciones lumbales de la mucosa de la túnica). Normalmente, el SID se enjuaga con solución salina y, opcionalmente, se almacena en un estado hidratado o deshidratado hasta su uso como se describe a continuación.

Las presentes composiciones fluidizadas se preparan como soluciones o suspensiones de la submucosa intestinal mediante trituración y/o digestión de la submucosa con una proteasa, tal como tripsina o pepsina, durante un periodo de tiempo suficiente para solubilizar dicho tejido y formar una solución esencialmente homogénea. El material de partida de la submucosa intestinal se tritura por medio de desgarramiento, corte, molido, cizallado, y similares. Se prefiere moler la submucosa en estado congelado o liofilizado, aunque se pueden obtener buenos resultados al someter una suspensión de pedazos de la submucosa a un tratamiento en una máquina mezcladora de alta velocidad (alto cizallamiento) y deshidratar, si es necesario, por centrifugación y decantación del exceso de agua. La submucosa intestinal triturada se puede secar para formar un polvo de submucosa. Posteriormente, se puede hidratar, es decir, combinar con agua o solución salina tamponada y opcionalmente otros excipientes farmacéuticamente aceptables para formar una composición de injerto de tejido como un fluido que tiene una viscosidad de aproximadamente 2 a aproximadamente 300.000 cps a 25 °C. Las composiciones de injerto de mayor viscosidad pueden tener una consistencia gelatinosa o pastosa. Las presentes composiciones pueden esterilizarse utilizando técnicas de esterilización reconocidas en la técnica, tales como la exposición a radiación ionizante.

La submucosa fluidizada de esta invención también encuentra uso como un heteroinjerto inyectable para tejidos, por ejemplo, tejidos blandos, que necesitan reparación o aumento, típicamente, para corregir traumatismos o defectos tisulares inducidos por enfermedades.

Suspensión de SID

Los especímenes de SID preparados como se ha descrito anteriormente se pican o trocean en trozos arbitrariamente pequeños utilizando tijeras de tejido, una cuchilla de afeitar de un solo filo u otro instrumento de corte apropiado. Los especímenes se colocan en un recipiente de fondo plano de acero inoxidable y se introduce nitrógeno líquido en el recipiente para congelar los especímenes y prepararlos para la trituración.

Los especímenes de SID congelados se Trituran para formar un polvo grueso de SID. Dicho procesamiento puede llevarse a cabo, por ejemplo, con una prensa de husillo manual con una lámina de latón cilíndrico colocado sobre los especímenes congelados. La lámina sirve como una interfaz entre los especímenes y el husillo de la prensa. El nitrógeno líquido se puede agregar periódicamente a los especímenes de SID para mantenerlos congelados.

Se pueden utilizar otros métodos para triturar especímenes de SID para producir un polvo de SID utilizable de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, los especímenes de SID se pueden liofilizar y luego moler utilizando una prensa de husillo manual o por otros medios de molienda. Alternativamente, el SID se puede procesar en una máquina mezcladora de alto cizallamiento para producir, al deshidratar y secar, un polvo de SID.

Se puede utilizar una molienda adicional del polvo de SID utilizando un mortero y un pilón previamente enfriados para producir un producto consistente y más finamente dividido. Nuevamente, se utiliza nitrógeno líquido según sea necesario para mantener las partículas sólidas congeladas durante la molienda final. El polvo puede hidratarse fácilmente utilizando, por ejemplo, solución salina tamponada para producir un material de injerto tisular fluidizado de esta invención a la viscosidad deseada.

Solución de SID

El polvo de SID se tamiza a través de una malla de alambre en cualquier recipiente conveniente. El polvo se somete luego a digestión proteolítica para formar una solución esencialmente homogénea. En una realización, el polvo se digiere con 1 mg/ml de pepsina (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) en ácido acético 0,1 M, ajustado a pH 2,5 con HCl, durante un periodo de 48 horas a temperatura ambiente. El medio de reacción se neutraliza con hidróxido de sodio para inactivar la actividad péptica. La submucosa solubilizada puede luego concentrarse por precipitación en sal de la solución y separarse para una purificación y/o liofilización adicional para formar una submucosa intestinal solubilizada con proteasa en forma de polvo.

La viscosidad de las composiciones de submucosa fluidizadas de acuerdo con esta invención puede manipularse controlando la concentración del componente de submucosa y el grado de hidratación. La viscosidad se puede ajustar a un intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 300.000 cps a 25 °C. Las composiciones de submucosa de baja viscosidad se adaptan mejor a aplicaciones intraarticulares o aplicaciones dentro de cavidades corporales. Las formulaciones de mayor viscosidad, por ejemplo, geles, pueden prepararse a partir de soluciones de digestión de SID ajustando el pH de tales soluciones aproximadamente 6,0 a aproximadamente 7,0. Las formas de gel de las presentes composiciones, como suspensiones de submucosa o soluciones de digestión de submucosa, se prefieren normalmente para aplicaciones subcutáneas o intramusculares utilizando jeringas o catéteres.

El gel de SID también se ha descrito por formarse al mezclar NaOH 0,1 N (1/10 del volumen de la solución de digestión) y 10X STF pH 7,4 (1/9 del volumen de la solución de digestión) en cantidades apropiadas a 4 °C. La solución se llevó al volumen y concentración deseados utilizando frío (4 °C) 1X STF pH 7,4 y se colocó en una incubadora a 37 °C para que se produjera la gelificación.

La MEC pudo formar una matriz después de 40 minutos en solución. El gel derivado de MEC era líquido a temperaturas por debajo de 20 °C, pero se convierte en un gel cuando la temperatura se eleva a 37 °C.

5 Al preparar geles a partir de MEC, todas las soluciones deben mantenerse en hielo y las siguientes variables han de determinarse de acuerdo con la patente de Estados Unidos n.º 8.361.503:

- C_f = concentración del gel final en mg/ml
- C_s = concentración de la solución de digestión MEC en mg/ml
- V_f = volumen de la solución de gel final necesaria para los experimentos
- 10 V_d = volumen necesario de la solución de digestión de MEC en ml
- V_{10x} = volumen de 10X STF necesario en ml
- V_{1x} = volumen de 1X STF necesario en ml
- V_{NaOH} = volumen de NaOH 0,1 N necesario en ml

15 En primer lugar, se determina la concentración final (C_f) y el volumen (V_f) del gel de MEC requerido. Luego, se calcula la masa de MEC necesaria multiplicando C_f (mg/ml)* V_f (ml). Este valor dará el volumen necesario de la solución de digestión de MEC (V_d), en la que $V_d = [C_f(\text{mg / ml}) * V_f (\text{ml})] / C_s$.

20 Se calcula el volumen de 10X STF necesario dividiendo el volumen calculado V_d por 9 ($V_{10x} = V_d/9$). Se calcula el volumen de NaOH 0,1 N necesario dividiendo el volumen calculado V_d por 10 ($V_{NaOH} = V_d/10$). Calcule la cantidad de 1X STF necesaria para llevar la solución a la concentración/volumen apropiados de la siguiente manera: $V_{1x} = V_f - V_d - V_{10x} - V_{NaOH}$. Se agrega todos los reactivos ($V_{1x} + V_d + V_{10x} + V_{NaOH}$) a un recipiente apropiado (generalmente tubos de centrifuga de 15 o 50 ml) sin la digestión de MEC (V_d). Se colocan las soluciones en hielo y se mantienen en hielo en todo momento.

25 Se agrega el volumen apropiado de la solución de digestión de MEC (V_d) a la mezcla de STF/NaOH preparada anteriormente y se mezcla bien con una micropipeta de 1 ml, teniendo cuidado y evitando la creación de burbujas de aire en la solución. Dependiendo de la viscosidad de la solución de digestión de MEC, puede haber una pérdida significativa de volumen durante la transferencia. Se supervisa el volumen total y se agregan cantidades apropiadas hasta que se logre el volumen final. Se mide el pH de la solución de pre-gel, en el que el pH debe encontrarse alrededor de 7,4.

30 Se agrega la solución de pre-gel a un molde o a pocillos apropiados. Se coloca el molde o los pocillos en una incubadora a 37 °C durante un mínimo de 40 minutos. Se evita utilizar una incubadora con control de CO₂. Si preocupa la evaporación del agua, se coloca el molde dentro de una bolsa plástica con cierre hermético antes de colocarlo en la incubadora. Después de la gelificación, el gel puede retirarse del molde y colocarse en 1X STF. Si los geles se hicieron en placas de cultivo de tejidos, se puede colocar 1X STF sobre los geles hasta su uso para mantener los geles hidratados. Cálculo de la muestra: Se preparan 6 ml de gel con una concentración final de 6 mg/ml de la solución madre de 10 mg/ml.

40 Procedimiento de administración de MEC-SID

45 La solución o suspensión de MEC-SID se puede administrar por enema en el colon de las ratas inducidas por CU. No se espera rechazo, infección o respuesta fisiológica anormal del animal huésped después de la administración del injerto. La solución o suspensión también se puede administrar por endoscopia y por laparoscopia en el colon. Se cree que un resultado inesperado de la presente invención será la estimulación de la remodelación tisular apropiada, de modo que el aumento de la mucosa del colon se pueda lograr con un material de solución o de suspensión de SID.

50 Las composiciones fluidizadas de esta invención pueden dar como resultado el reemplazo y reparación de tejidos, y además dar como resultado un tratamiento o curación de la EII, incluida la CU. Las composiciones submucosas fluidizadas se utilizan de acuerdo con el presente método para inducir el recrecimiento del tejido de la mucosa de colon natural. Al inyectar una cantidad efectiva de una composición de MEC fluidizada en el lugar del tejido defectuoso, las propiedades biotrópicas pueden aparecer sin la necesidad de técnicas quirúrgicas más invasivas.

55 Aunque la invención se ha descrito en detalle con referencia a ciertas realizaciones preferidas, existen variaciones y modificaciones dentro del alcance definido en las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición para su uso en el tratamiento, mejora o curación de una afección o enfermedad del tejido del tracto intestinal inferior de un vertebrado, o del daño de dicho tejido, comprendiendo dicha composición un injerto o un armazón de matriz extracelular (MEC) derivado de una submucosa de intestino delgado (SID) para producir o estimular la migración de células madre o células progenitoras al tejido enfermo o dañado, para promover un tejido reconstructivo que remodela el tejido enfermo o dañado para efectuar el tratamiento, la mejora, o la cura del tejido enfermo, o dañado, sin colectomía.
- 10 2. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la composición se prepara para administrarse como un fluido seleccionado entre una solución, una suspensión y un gel.
- 15 3. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la composición se prepara para administrarse como una lámina sólida o tubo sólido.
4. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la composición está formulada para una administración endoscópica o una administración por enema.
- 20 5. La composición para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la composición comprende además un fármaco o un producto biológico.
- 25 6. La composición para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el tejido intestinal inferior está enfermo o dañado como resultado de la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, poliposis adenomatosa familiar, enfermedad de Hirschsprung; estenosis; proctitis; cáncer de colon o rectal, o fístula.
- 30 7. La composición para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la composición se aplica implantando, trasplantando, administrando, aplicando, adhiriendo o fijando dicha composición sobre el tejido del tracto intestinal inferior enfermo o dañado, por lo que la afección, la enfermedad, o el daño al tejido del tracto intestinal inferior se trata, mejora, o cura, mediante la remodelación del tejido reconstructivo, sin colectomía.
- 35 8. La composición para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el tejido que presenta la afección, la enfermedad, o el daño, es el colon.
9. La composición para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que dicha composición se aplica en un vertebrado después de la resección o ablación del tejido en el tracto intestinal inferior que presenta la afección, la enfermedad, o el daño.
- 40 10. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que la resección o ablación comprende una resección endoscópica de la mucosa, o un lavado con EDTA.

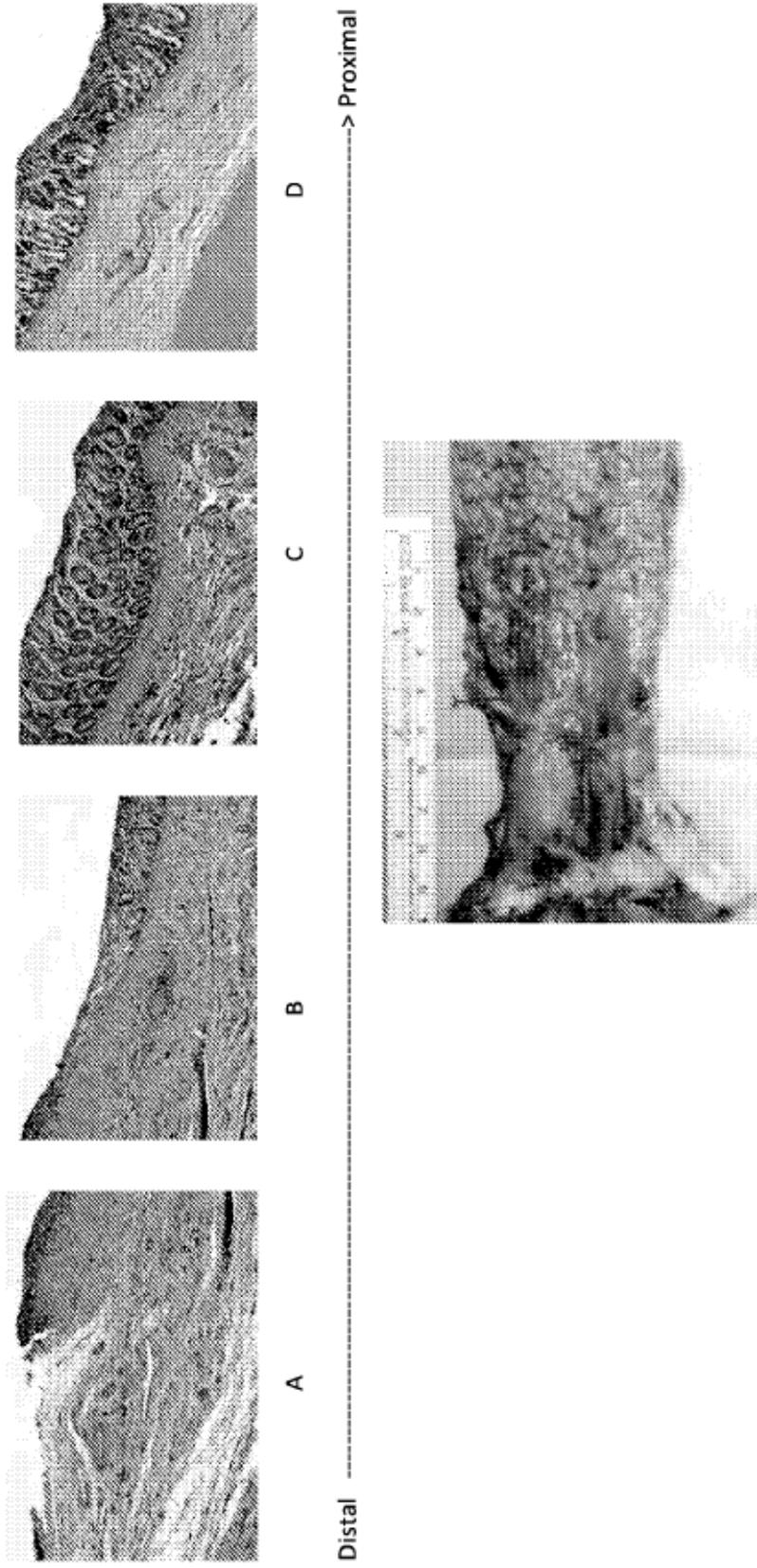


FIG. 1

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

La lista de referencias citadas por el solicitante es para la conveniencia del lector solamente. No forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto gran cuidado para la recopilación de las referencias, no se puede excluir la existencia de errores u omisiones y la Oficina de Patentes Europea declina toda responsabilidad al respecto.

5

Documentos de patente citados en la descripción

- US 8361503 B [0025] [0048] [0089]
- US 4902508 A [0078]
- US 5275826 A [0078]
- US 5514533 A [0078]

10