(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 710 024**

(51) Int. CI.:

A61L 27/36 (2006.01)
A01N 27/00 (2006.01)
A61F 2/00 (2006.01)
A61K 35/54 (2015.01)
A61K 35/50 (2015.01)
C12N 5/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2003 E 13181876 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2018 EP 2702871**

(54) Título: **Biotejido de colágeno y uso del mismo**

(30) Prioridad:

26.03.2002 US 106653

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.04.2019

(73) Titular/es:

CELULARITY, INC. (100.0%)
33 Technology Drive
Warren, NJ 07059, US

(72) Inventor/es:

HARIRI, ROBERT J.;
KAPLUNOVSKY, ALEKSANDR M. y
MURPHY, PATRICIA A.

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

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

Biotejido de colágeno y uso del mismo

Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones que comprenden membranas de colágeno producidas a partir de amnios, denominado en la presente memoria biotejido de colágeno, para uso en cirugía. El biotejido de colágeno de la invención tiene la integridad estructural de la membrana amniótica sin tratar nativa, es decir, la estructura terciaria y cuaternaria nativa. En la presente memoria se describe un método para preparar un biotejido de colágeno a partir de membrana de placenta, preferentemente una membrana de placenta humana que tiene una membrana coriónica y amniótica, por descelularización de la membrana amniótica. Tal método no forma parte de la invención. Según la invención, la membrana amniótica está completamente descelularizada. La composición que comprende biotejido de colágeno de la invención tiene numerosos usos en el campo médico y quirúrgico incluyendo, por ejemplo, reparación de vasos sanguíneos, construcción y sustitución de un vaso sanguíneo, sustitución de tendones y ligamentos, vendaje de heridas, injertos quirúrgicos, usos oftálmicos, suturas y otros. Los beneficios del biotejido se deben, en parte, a sus propiedades físicas tales como resistencia biomecánica, flexibilidad, capacidad de sutura, y baja inmunogenicidad, particularmente cuando se deriva de placenta humana.

Antecedentes de la invención

Membrana amniótica: anatomía e histología

El saco placentario está formado por dos capas conectadas estrechamente mediante tejido conjuntivo laxo. Se conocen como las capas amniótica y coriónica (véase la fig. 1). La capa amniótica es la más interna de las dos capas y entra en contacto con el fluido amniótico que rodea al feto y en conjunto forman el saco amniótico. La capa amniótica es avascular y está revestida con epitelio columnar sencillo que recubre una membrana basal y tiene un espesor de 30-60 micrómetros. La membrana coriónica es la capa más externa del saco y está muy celularizada. El árbol vascular se origina en la placenta y se extiende a las membranas de la placenta a través de la capa coriónica. La capa coriónica se separa de la capa amniótica mediante tejido colector flexible y combinadas, las dos capas miden 120-180 micrómetros. Las membranas de la placenta tienen una matriz de colágeno que está muy cargada de mucopolisacáridos y se cree que sirven principalmente como un saco protector para el feto en desarrollo. Las membranas también mantienen una barrera para agentes infecciosos e inmunológicos presentes en la circulación materna. Las membranas de la placenta tienen medios de transporte tanto activos como pasivos. La mayoría de las moléculas pequeñas y proteínas pueden viajar libremente a través de ellos, pero las proteínas grandes como IgM no pueden cruzar a través de la capa basal.

La conservación de las membranas de la placenta (que son de fuentes animales o humanas) en alcohol etílico al 95% o glicerol mezclados en proporciones de un 50-50% con medios de cultivo tisular se ha usado para la conservación de la membrana amniótica antes de su congelación. Estos conservantes eliminan la vitalidad de los tejidos de placenta haciendo los núcleos picnóticos pero la matriz de colágeno y las membranas básales se conservan. De forma interesante, ambas formas de conservación también eliminan la antigenicidad de las membranas trasplantadas y también cualquier agente potencialmente virulento. La conservación nuevamente se consigue después de que las membranas amnióticas se separen cuidadosamente del corión. El lado de la membrana amniótica con la lámina y epitelio basales es brillante y el lado opuesto frente al corión no tiene brillo.

Aplicaciones clínicas previas de las membranas amnióticas

Los posibles problemas potenciales con tejidos xenogénicos (tejidos de otras especies) portadores de enfermedades zoonóticas o que causan rechazo entre especies han provocado que estos tejidos resulten menos deseables. Los injertos alogénicos, o injertos de diferentes individuos de la misma especie, siguen siendo la fuente preferente de materiales para injerto en seres humanos. La escasez de tejidos de donantes humanos para injerto es un problema creciente que ha estimulado el desarrollo de nuevos materiales para injerto de tejido. Muy a menudo estas fuentes de material biológico de partida son escasas, difíciles de obtener, y con un coste muy elevado. Sin embargo, la lámina de colágeno de amnios humano tiene características biomecánicas deseables útiles en aplicaciones de injerto de tejido. Por lo tanto, las membranas amnióticas son una buena fuente de material de injerto alogénico.

La membrana fetal que incluye la membrana amniótica y coriónica se ha usado en cirugías documentadas ya en 1910 y ha sido revisada por Trelford y Trelford-Sauder en 1979 (véase Trelford y Trelford-Sauder, 1979, Am. J. Obstet. Gynecol. 833). En 1910, Davis fue el primero en informar del uso de membranas fetales como un material quirúrgico en trasplantes de piel, por ejemplo en pieles quemadas y ulceradas (Davis et al., 1910, Johns Hopkins Med. J.; 15: 307). Estos estudios se realizaron principalmente en animales y los ensayos en seres humanos fueron decepcionantes. Desde entonces se ha expandido el uso de las membranas amnióticas en cirugía (ver, p.ej., Stern et al., 1913, JAMA, 13: 973-4; Sabella et al., 1913 Med. Records NY, 83: 478-80; de Rotth et al., 1940 Arch. Opthalmol, 23: 522-5; Sorsby et al., 1946, Br. J. Opthamlol. 30: 337-45). En la actualidad se usa como un apósito biológico para piel quemada, heridas en la piel, y úlceras crónicas en las piernas, como un tejido adyuvante en la reconstrucción quirúrgica de vagina artificial, y para la reparación de onfaloceles (Véase por ejemplo, Trelford y Trelford-Sauder, 1979, 134 Am. J. Obstet. Gynecol. 833; Colocho et al., 1974 Arch. Surg. 109: 370-3; Faulk et al. 1980, Lancet, 1156; Prasad

et al., 1986, J. Trauma, 26: 945-6; Subrahmanyan et al., 1995, J. Plastic Surg. 48: 477-8; Gruss et al., 1978, J. Can. Med. Assoc. 118: 1237-46; Ward et al., 1984, Br. J. Plastic Surg. 37: 191-3; Dhall, 1984, J. Obstet. Gynaecol. 91: 279-82). También se ha usado para prevenir la adherencia de tejido en procedimientos quirúrgicos del abdomen, cabeza y pelvis (Gharib etal., 1996, Pediatr. Surg. Int. 11: 96-9; Rennekampff et al., 1994, Invest. Surg. 7: 187-93). En la década de 1940, varios autores informaron del papel beneficioso de la membrana amniótica en el tratamiento de una diversidad de trastornos de la superficie ocular (véase, por ejemplo, de Rotth et al., 1940 Arch. Opthalmol, 23: 522-5; Sorsby et al., 1946, Br. J. Opthalmol. 30: 337-45; Lavery et al., 1946, Trans. Opthalmol. Soc. UK, 66: 668).

Se han descrito anteriormente numerosos intentos realizados para optimizar la preparación y conservación de las membranas amnióticas para uso en trasplante (véase, por ejemplo, Dua et al., 1999, Br. J. Opthalmol. 83: 748-52 ("Dua") para una revisión). Diversas preparaciones de membranas amnióticas han incluido conservación con mezclas de solución salina y antibiótico, deshidratación con alcohol con o sin separación de la capa amniótica de la capa coriónica. Sin embargo, todos los métodos que se describen en Dua, y en las referencias que se han descrito anteriormente aún presentan deficiencias que es necesario abordar mediante mejoras en la preparación y conservación de las membranas amnióticas.

Más recientemente, se han descrito métodos que se basan en la congelación para la conservación de la membrana amniótica para su aplicación en procedimientos quirúrgicos de injerto de tejido para corregir defectos epiteliales de la córnea. Ver, p.ej., las patentes US nº 6.152.142 y nº 6.326.019B1 ("Tseng"). Tseng describe una membrana amniótica que está montada sobre un sustrato y se conserva en una mezcla de medio de Eagle modificado por Dulbecco y glicerol y se congela a -80°C. El procedimiento de congelación del tejido en cualquier tiempo durante su preparación fragiliza la membrana amniótica de Tseng, y la fragiliza todavía más después de las etapas de descongelación y activación. El proceso de congelación del tejido en cualquier momento durante su preparación hace que la membrana amniótica de Tseng sea frágil, e incluso más frágil después de las etapas de descongelación y activación. Además, las etapas de descongelación y activación añaden tiempo necesario para la manipulación de la membrana amniótica. Además, debido a la fragilidad de la membrana amniótica de Tseng causada por la etapa de congelación en el proceso de conservación y preparación, se requiere un soporte o apoyo estructural para garantizar la integridad estructural de la membrana amniótica de Tseng durante el almacenamiento. Esto presenta la dificultad añadida de separar la membrana amniótica conservada del respaldo, el cual, debido a su fragilidad, puede ser difícil de manipular y separar intacto. La separación de la membrana amnios del soporte aumenta de este modo la probabilidad de ruptura de la membrana, y aumenta el periodo de tiempo necesario para activar la membrana amniótica para permitir la impregnación a fondo de la solución de activación en la membrana amniótica congelada antes de realizar el procedimiento quirúrgico, lo que conduce al aumento del tiempo de preparación en la sala de cirugía. El almacenamiento y el transporte también se complican por la necesidad de congelación a – 80 °C. Por último, las membranas de Tseng por lo general no están descelularizadas; como resultado, las membranas amnióticas preparadas de este modo por lo general son opacas y no tienen una composición estructural uniforme.

Más recientemente, Yui et al., la patente US n° 5.618.312 (la "patente 312") describe la preparación de láminas de colágeno a partir de estrato compacto de la membrana de tejido. Aunque el material descrito es principalmente colágeno, es lo suficientemente débil debido a su procesamiento para requerir una etapa separada de reticulación con el fin de hacer que sea lo suficientemente resistente para uso médico, por ejemplo, que se pueda suturar. En la Patente 312 se describe un método para reticulación que usa el tratamiento a alta temperatura, preferentemente de 100 ° a 110 °C, el cual se cree que afecta de forma adversa a la conformación nativa del colágeno. Yui et al., patente US n° 5.876.451 describe un material de colágeno similar obtenidos a partir de placenta. Este material, sin embargo, se trata durante la preparación con proteasas como parte de una etapa de descelularización, lo que probablemente tal como resultado la destrucción y/o interrupción de la conformación nativa de los componentes de la matriz; por lo tanto, la matriz de colágeno resultante no mantiene su conformación nativa.

La patente US nº 6.152.142 (Tseng) se refiere a un método de preparación, almacenamiento y uso de un injerto quirúrgico de membrana amniótica humana que se ha separado de la membrana coriónica y en el que la membrana amniótica se mantiene en estado hidratado en todo momento, incluso durante el almacenamiento. La solución de almacenamiento comprende un medio de cultivo y un agente hiperosmótico, en el que se mantiene la hidratación de la membrana amniótica.

Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de una membrana amniótica mejorada para uso en aplicaciones médicas, de diagnóstico, y cosméticas, que tenga mejores características estructurales. La presente invención proporciona composiciones que comprenden dicho biotejido, que comprende colágeno que, a diferencia de los biotejidos a base de colágeno anteriores, mantiene la estructura ternaria y cuaternaria del colágeno nativo. Como resultado, el biotejido de colágeno de la presente invención se prepara fácilmente, se usa fácilmente, y es lo suficientemente resistente para fines médicos y quirúrgicos, y proporciona un sustrato superior para la curación de heridas.

Compendio de la invención

La presente invención proporciona una composición que comprende un biotejido de colágeno para uso en cirugía, en la que: dicho biotejido de colágeno comprende una membrana amniótica humana deshidratada, descelularizada y libre de sustrato, en la que dicha membrana amniótica presenta una estructura terciaria y cuaternaria nativa.

En algunas realizaciones, la composición se utiliza como injerto quirúrgico.

En otras realizaciones, el biotejido de colágeno en la composición comprende elastina y fibronectina. En una realización específica, la composición comprende un laminado de membrana amniótica que comprende por lo menos dos capas del biotejido de colágeno.

En una realización, la composición se aplica directamente en un sitio quirúrgico de un sujeto. En realizaciones específicas, el sitio quirúrgico se selecciona del grupo que consiste en un ojo, piel, una superficie serosa del abdomen, una superficie serosa de la cavidad torácica, un pericardio seroso, una superficie mucosa de la cavidad oral, una superficie mucosa de la cavidad nasal, una superficie del tracto respiratorio, una superficie del tracto gastrointestinal y una superficie del tracto urogenital.

En otras realizaciones, la composición se aplica en un sitio interior del cuerpo de un sujeto, o en un sitio exterior del cuerpo de un sujeto. En una realización particular, la composición es para uso durante una cirugía para evitar la fuga de sangre por líneas de sutura o para cubrir sitios de anastomosis durante la cirugía. En otra realización, las composiciones están destinadas al uso durante una cirugía intraperitoneal para evitar la adhesión. En todavía otra realización, la composición está destinada el uso durante una cirugía cerebral para prestar apoyo a la reparación dural. En todavía otra realización, la composición está destinada al uso como sustrato para fomentar la regeneración nerviosa en el sistema nervioso central y periférico. En otra realización, la composición está destinada al uso en la reconstrucción de tejidos blandos para evitar la adhesión en reparaciones de articulaciones o tendones.

En alguna realizaciones, el biotejido de colágeno comprendido en la composición para uso de la invención se impregna con una biomolécula, preferentemente un antibiótico, una hormona, un factor de crecimiento, un agente antitumoral, un agente antifúngico, un agente antivírico, un antihistamínico, un agente antiinflamatorio, un agente antiinfeccioso, plata elemental, una enzima bactericida, un agente de cicatrización de heridas, ácido hialurónico, un sellante de heridas, un atrayente celular o un reactivo de andamiaje. En una realización particular, el antibiótico se selecciona del grupo que comprende clindamicina, minociclina, doxiciclina y gentamicina.

En algunas realizaciones, el biotejido de colágeno comprendido en el a composición para uso de la invención se llena con células, preferentemente células madre específicas de tejido, células progenitoras comprometidas, células fibroblastoides, condrocitos, hepatocitos, células hematopoyéticas, células parenquimatosas pancreáticas, neuroblastos y células progenitoras musculares.

La presente invención proporciona además un injerto quirúrgico que comprende un biotejido de colágeno, en el que el biotejido de colágeno comprende una membrana amniótica humana deshidratada, descelularizada y libre de sustrato, en la que dicha membrana amniótica presenta una estructura terciaria y cuaternaria nativa.

Dentro de los límites de la presente invención, la referencia a un biotejido de colágeno, un biotejido y una membrana amniótica de la invención en la descripción a continuación implica el biotejido de colágeno y la membrana amniótica comprendida en la composición para uso en cirugía o comprendida en el injerto quirúrgico de la presente invención según se define en las reivindicaciones.

En la presente memoria se describe un método de preparación de un biotejido de colágeno a partir de placenta, preferentemente una placenta humana, que resulta en un biotejido de colágeno con propiedades físicas y biofísicas mejoradas. Preferentemente el método de la preparación Implica una manipulación mínima de la membrana amniótica. Un método de preparación no forma parte de la invención. El biotejido de colágeno de la invención, a diferencia de los descritos en la técnica anterior, debido a la forma en la que se procesan, presentan una estructura terciaria y cuaternaria nativa intactas. La composición de la presente invención comprende además una membrana amniótica o biotejido derivados de placenta que presentan características superiores de aumento de la resistencia a la tracción, capacidad de sutura, e inmunogenicidad reducida que da como resultado una reducción del rechazo de huésped-injerto. La composición de la presente invención puede almacenarse en forma de láminas deshidratadas sin congelación o crioconservación. Preferentemente, la membrana amniótica derivada de placenta se deriva de una placenta humana para uso en pacientes humanos. Sin embargo, se pueden usar los mismos métodos usando placentas de diversas especies animales para uso veterinario en pacientes animales.

En la presente memoria se describe además un método para preparar un biotejido de colágeno que comprende proporcionar una placenta, preferentemente una placenta humana, separar las capas amniótica y coriónica la una de la otra, y descelularizar la membrana amniótica a la vez que se conserva la arquitectura de la matriz extracelular subyacente. El método también implica el lavado y el secado de la membrana descelularizada. Este método proporciona un biotejido deshidratado, descelularizado que puede permanecer estable en condiciones estériles de almacenamiento a temperatura ambiente y que posteriormente se vuelve a hidratar y se injerta a o se implanta en un sujeto.

La placenta puede proceder de una hembra humana que ha pasado por un parto por cesárea o un parto natural. Se usan ensayos serológicos y bacteriológicos comunes para el experto en la materia para determinar si la placenta es de un donante que está libre de una enfermedad transmisible. Además, la placenta puede someterse a ensayo para definir que está libre de por lo menos una enfermedad transmisible. La fuente de la placenta puede ser conocida, incluyendo el historial médico, el tipo sanguíneo, los datos inmunológicos y las características de genotipo del donante.

Aunque la placenta puede ser de cualquier mamífero, el donante es preferentemente una hembra humana. La exsanguinación de la placenta puede llevarse a cabo mediante métodos comunes conocidos por el experto en la materia antes de separar la membrana amniótica de la membrana coriónica.

La descelularización de la membrana amniótica comprende eliminar todo el material celular visible y residuos celulares de la membrana amniótica, p.ej., de la cara materna de la membrana amniótica y de la cara fetal de la membrana amniótica. La descelularización de la membrana amniótica no debería dar como resultado la alteración de la Integridad estructural de la membrana amniótica ni alterar la composición bioquímica. Por consiguiente, la descelularización de la membrana amniótica no supone la congelación en ningún punto durante la preparación de la membrana amniótica o en la puesta en contacto de la membrana con una proteasa. Preferentemente, la membrana amniótica se descelulariza usando una solución que contiene un detergente débil, por ejemplo, una solución que comprende monohidrato de sal sódica del ácido desoxicólico al 0,01-1,0%, un detergente no iónico, Tritón X-100, un detergente aniónico, o dodecil sulfato sódico o a una combinación de los mismos.

Una vez la membrana amniótica ha sido descelularizada, la membrana puede lavarse y secarse, preferentemente con calor suave bajo vacío.

La invención proporciona una composición que comprende biotejido de colágeno que comprende una membrana amniótica deshidratada, descelularizada y libre de sustrato, de manea que la membrana presenta la estructura terciaria y cuaternaria nativas para uso en cirugía. En otras realizaciones, el biotejido de colágeno que comprende una membrana amniótica descelularizada libre de sustrato, que comprende colágeno, elastina y fibronectina. En todavía otras realizaciones, el biotejido de colágeno comprende una membrana amniótica deshidratada, descelularizada, uniforme, translúcida, y libre de sustrato, con la condición de que la membrana amniótica nunca haya estado en contacto con una proteasa.

En algunas realizaciones, el biotejido comprende además una o más biomoléculas, por ejemplo, agentes terapéuticos, que incluyen antibióticos, hormonas, factores de crecimiento, agentes antitumorales, agentes antifúngicos, agentes antivirales, medicamentos para el dolor, antihistamínicos, agentes antiinflamatorios, agentes antiinfecciosos, agentes para curación de heridas, selladores de heridas, atrayentes celulares y reactivos de andamiajes. En un ejemplo específico, el biotejido de colágeno puede estar impregnado con uno o más factores de crecimiento, por ejemplo, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento epitelial, etc. El biotejido también se puede impregnar con una o más moléculas pequeñas, incluyendo moléculas orgánicas pequeñas, tales como inhibidores específicos de procesos bioquímicos particulares, por ejemplo, inhibidores de receptores de membrana, inhibidores de quinasas, inhibidores de crecimiento, fármacos anticáncer, antibióticos, etc. En algunas realizaciones, el biotejido de colágeno se impregna con una biomolécula, durante la producción o durante la preparación para cirugía dependiendo de su uso previsto.

En algunas realizaciones, la invención comprende un laminado de membrana amniótica que comprende por lo menos dos capas del biotejido de la invención. En la presente memoria se describen además métodos de preparación del mismo. En otras realizaciones, la invención comprende conformar los laminados en andamiajes tridimensionales dependiendo del uso pretendido, que incluye, láminas, fibras, esferas y tubos.

En la presente memoria se describe además un método para preparar un laminado de membrana amniótica que comprende: proporcionar una placenta que comprende una membrana amniótica y una membrana coriónica; separar la membrana amniótica respecto de la membrana coriónica; y descelularizar la membrana amniótica. El método comprende además lavar la membrana amniótica descelularizada al menos una vez; formar capas de al menos dos de las membranas amnióticas descelularizadas en contacto entre sí de modo que se forma un laminado de membrana amniótica; y secar el laminado de membrana amniótica descelularizada. Además, el método para preparar un laminado de membrana amniótica comprende, secar al menos dos membranas amnióticas preparadas de acuerdo con los métodos de la invención, y formar capas de al menos dos membranas amnióticas en contacto entre sí de modo que se forma un laminado de membrana amniótica.

En algunas realizaciones, las capas de membrana amniótica se ponen en contacto mutuo en presencia de un adhesivo para formar un laminado de membrana amniótica. El adhesivo utilizado según las composiciones de la invención puede ser cualquier pegamento biológico conocido por el experto en la materia, preferentemente un pegamento biocompatible, incluyendo pegamento natural, p.ej., fibronectina, fibrina o pegamento sintético. En otras realizaciones, las capas de membrana amniótica se entrecruzan entre sí para formar un laminado de membrana amniótica. Puede utilizarse cualquier reactivo de entrecruzamiento y método conocido por el experto en la materia, incluyendo el entrecruzamiento químico, el entrecruzamiento peptídico, el entrecruzamiento por UV, el entrecruzamiento con radiación, el entrecruzamiento de fibronectina, el entrecruzamiento de fibrinógeno o el entrecruzamiento de hidrogel. En otras realizaciones, los laminados de membrana amniótica no comprenden un adhesivo.

En algunas realizaciones, la invención comprende utilizar la composición que comprende el biotejido de colágeno de la invención como injerto quirúrgico. En una realización específica, la invención comprende el uso del injerto quirúrgico en un procedimiento quirúrgico en un sujeto, preferentemente un ser humano, que comprende aplicar el injerto directamente sobre el sitio quirúrgico.

En algunas realizaciones, el biotejido de colágeno comprende un laminado de membrana amniótica, o un andamiaje tridimensional del mismo que comprende además una o más composiciones de hidrogel. La composición de hidrogel debe comprender un polímero que incluye alcohol polivinílico, polietilenglicol, ácido hialurónico, y derivados y análogos de los mismos.

En algunas realizaciones, el biotejido de colágeno de la invención, laminados, andamiajes tridimensionales, o composiciones de hidrogel de los mismos se pueden poblar adicionalmente con células, tales como células madre, células adultas diferenciadas, células progenitoras, preferentemente humanas de modo que las células sean uniformes y confluyentes.

En la presente memoria se describen además métodos de producción de alto nivel de biotejido de colágeno, laminados del mismo, andamiajes tridimensionales del mismo y composiciones de hidrogel del mismo, particularmente, aunque sin limitación, la producción a escala comercial. El método resuelve las dificultades de la producción de cantidades a gran escala de membranas amnióticas para uso en ensayos clínicos y la comercialización.

La invención comprende composiciones que comprenden un biotejido de colágeno de la invención para uso en cirugía, tal como para la administración de fármaco, la ingeniería de tejidos, usos relacionados urológicos, p.ej., la corrección de la incontinencia urinaria; usos oftalmológicos, p.ej., para el tratamiento de un trastorno de la superficie ocular, y como injerto quirúrgico oftálmico; usos vasculares, p.ej., la reparación de vasos sanguíneos, la construcción y sustitución de un vaso sanguíneo; usos cardiológicos, p.ej., como dispositivo prostético en la construcción de válvulas enfermas; usos relacionados con neuronas, p.ej., la reparación de nervios lesionados, especialmente nervios periféricos seccionados, como sustituto dural, y como prótesis en torno a anastomosis nerviosas; usos relacionados con huesos, p.ej., para el tratamiento de defectos ortopédicos, como sustitución ósea, usos dermatológicos, p.ej., para el tratamiento de heridas (externas e internas), heridas agudas y crónicas, heridas congénitas, y quemaduras; para el tratamiento de condiciones de la piel, p.ej., lesiones en la piel, piel envejecida, arrugas, líneas finas, adelgazamiento, elasticidad reducida de la piel, piel rugosa, y piel dañada por el sol, como vendaje para heridas, y para el tratamiento de infecciones de heridas.

En una realización específica, puede utilizarse un injerto quirúrgico que comprende un biotejido de colágeno de la invención en un método para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad o trastorno relacionada con los ojos, p.ej., una enfermedad de la superficie ocular, en un sujeto, que comprende utilizar el biotejido de colágeno de la invención, por ejemplo aplicando el biotejido como injerto quirúrgico sobre la superficie corneal enferma del sujeto. En otra realización, el injerto quirúrgico de la invención puede utilizarse en un método de tratamiento y/o prevención de una condición de la piel en un sujeto, que comprende utilizar un biotejido de la invención, por ejemplo, poniendo en contacto la piel con el biotejido. En todavía otra realización, el injerto quirúrgico de la invención puede utilizarse en el tratamiento de una herida y/o quemadura en un sujeto, que comprende poner en contacto la herida y/o quemadura con un biotejido de la invención. En otra realización específica, el injerto quirúrgico de la invención puede utilizarse en un método de corrección de la incontinencia urinaria en un sujeto, preferentemente, un ser humano, que comprende utilizar un biotejido de colágeno de la invención como implante.

En otras realizaciones, la invención comprende utilizar una composición de la invención para administrar un agente terapéutico en un sujeto, que comprende poner en contacto el sujeto con un biotejido de colágeno de la invención. La invención comprende además utilizar una composición de la invención para administrar células en un sujeto, que comprende poblar un biotejido de colágeno o laminado de la invención con células vivas, por ejemplo en la ingeniería de tejidos.

La invención proporciona un injerto quirúrgico que comprende el biotejido de la invención para uso en un procedimiento quirúrgico. El injerto quirúrgico se puede aplicar a un sitio interno o externo del sujeto, preferentemente un ser humano.

Breve descripción de las figuras

Fig. 1. El corion y la membrana amniótica de una placenta humana.

Fig. 2. Fotomicrografía del biotejido de colágeno.

A. ANTES DEL PROCESAMIENTO

B. DESPUÉS DEL PROCESAMIENTO

Fig. 3. El biotejido de colágeno. El biotejido de colágeno de la invención se ejemplifica como presentando una superficie translúcida uniforme con un patrón en relieve.

Fig. 4. Marco de malla y biotejido seco dentro del mismo.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona una composición que comprende un biotejido de colágeno para uso en: Cirugía, en la que dicho biotejido de colágeno comprende una membrana amniótica humana deshidratada, descelularizada y libre de sustrato, en la que dicha membrana amniótica presenta una estructura terciaria y cuaternaria nativa.

En algunas realizaciones, la composición se utiliza como injerto quirúrgico.

En otras realizaciones, el biotejido de colágeno en la composición comprende elastina y fibronectina. En una realización específica, la composición comprende un laminado de membrana amniótica que comprende por lo menos dos capas del biotejido de colágeno.

En una realización, la composición se aplica directamente en un sitio quirúrgico de un sujeto. En realizaciones específicas, el sitio quirúrgico se selecciona del grupo que consiste en un ojo, piel, una superficie serosa del abdomen, una superficie serosa de la cavidad torácica, un pericardio seroso, una superficie mucosa de la cavidad oral, una superficie mucosa de la cavidad nasal, una superficie del tracto respiratorio, una superficie del tracto gastrointestinal y una superficie del tracto urogenital.

En otras realizaciones, la composición se aplica en un sitio interior del cuerpo de un sujeto, o en un sitio exterior del cuerpo de un sujeto. En una realización particular, la composición está destinada al uso durante una cirugía para evitar la fuga de sangre por líneas de sutura o para cubrir sitios de anastomosis durante la cirugía. En otra realización, las composiciones están destinadas al uso durante una cirugía intraperitoneal para evitar la adhesión. En todavía otra realización, la composición está destinada al uso durante una cirugía cerebral para prestar apoyo a la reparación dural. En todavía otra realización, la composición está destinada al uso como sustrato para fomentar la regeneración nerviosa en el sistema nervioso central y periférico. En otra realización, la composición está destinada al uso en la reconstrucción de tejidos blandos para evitar la adhesión en reparaciones de articulaciones o tendones.

En alguna realizaciones, el biotejido de colágeno comprendido en la composición para uso de la invención se impregna con una biomolécula, preferentemente un antibiótico, una hormona, un factor de crecimiento, un agente antitumoral, un agente antifúngico, un agente antivírico, un antihistamínico, un agente antiinflamatorio, un agente antiinfeccioso, plata elemental, una enzima bactericida, un agente de cicatrización de heridas, ácido hialurónico, un sellante de heridas, un atrayente celular o un reactivo de andamiaje. En una realización particular, el antibiótico se selecciona del grupo que comprende clindamicina, minociclina, doxiciclina y gentamicina.

En algunas realizaciones, el biotejido de colágeno comprendido en la composición para uso de la invención se llena con células, preferentemente células madre específicas de tejido, células progenitoras comprometidas, células fibroblastoides, condrocitos, hepatocitos, células hematopoyéticas, células parenquimatosas pancreáticas, neuroblastos y células progenitoras musculares.

La presente invención proporciona además un injerto quirúrgico que comprende un biotejido de colágeno, en el que el biotejido de colágeno comprende una membrana amniótica humana deshidratada, descelularizada y libre de sustrato, en la que dicha membrana amniótica presenta una estructura terciaria y cuaternaria nativa.

Generalmente, la presente invención se refiere a una membrana o biotejido de colágeno derivado de la placenta de un mamífero, preferentemente de un ser humano. El biotejido de colágeno se prepara para que mantenga la conformación nativa del colágeno, es decir, la conformación terciaria y cuaternaria nativa, en el producto final. Además del biotejido de colágeno, en el presente documento se describen además métodos para preparar el biotejido de colágeno, y para usar el biotejido en una instalación médica.

La presente invención proporciona una composición que comprende un biotejido de colágeno que comprende una membrana amniótica deshidratada, descelularizada y libre de sustrato de modo que la membrana amniótica tenga una estructura terciaria y cuaternaria nativa para uso en cirugía. En algunas realizaciones de la invención, el biotejido de colágeno descelularizado y libre de sustrato comprende además colágeno, elastina y fibronectina.

En algunas realizaciones, la composición para uso en la invención comprende además un laminado de membrana amniótica que comprende un biotejido de colágeno de la invención. El laminado de membrana amniótica comprende por lo menos dos capas del biotejido de colágeno que se aplican en contacto mutuo formando el laminado de membrana amniótica. En otras realizaciones, la composición para uso en la invención comprende un andamiaje tridimensional, tal como un tubo, que comprende un biotejido de colágeno de la invención. En todavía otras realizaciones, la composición para uso en la invención comprende un biotejido de colágeno de la invención, un laminado del mismo, o un andamiaje tridimensional del mismo que comprende además una composición de hidrogel.

La composición e injertos quirúrgicos de la invención comprenden de esta manera diversas formas y configuraciones del biotejido de colágeno, incluyendo laminados, andamiajes tridimensionales y composiciones de hidrogel. La invención proporciona cualquiera forma médica quirúrgicamente útil de las composiciones de injerto quirúrgico de la invención. Independientemente de la forma o configuración particular, las composiciones de la invención pueden comprender además una o más biomoléculas, preferentemente un agente terapéutico. Las composiciones de injerto quirúrgico de la invención que comprenden una biomolécula tienen numerosos usos en el campo médico quirúrgico, tal como se describe en detalle en la presente memoria. En algunas realizaciones, la invención comprende llenar las composiciones de la invención con células vivas con el fin de que las células sean uniformes y confluyentes. Las composiciones e injertos quirúrgicos de la invención poblados con células tienen numerosos usos en el campo médico y dental para fines de ingeniería de tejidos.

En la presente memoria se describen además métodos para preparar un biotejido de colágeno, un laminado del mismo,

un andamiaje tridimensional del mismo, o una composición de hidrogel. En un ejemplo específico, en la presente memoria se describe un método para preparar un biotejido de colágeno procedente de una placenta, que tiene una membrana amniótica y una membrana coriónica, que comprende: separar la membrana amniótica respecto de la membrana coriónica; y descelularizar la membrana amniótica con el fin de que la membrana amniótica no esté en contacto con una enzima, por ejemplo, una proteasa. En otros ejemplos, el método implica adicionalmente lavar y secar la membrana amniótica descelularizada. En otro ejemplo, en la presente memoria se describe un método para preparar un laminado de membrana amniótica a partir de una placenta que tiene una membrana amniótica y una membrana coriónica, que comprende: separar la membrana amniótica respecto de la membrana coriónica, descelularizar la membrana amniótica, y formar capas de al menos dos de las membranas amnióticas descelularizadas en contacto entre sí de modo que se forme un laminado de membrana amniótica. La membrana amniótica descelularizada se seca antes de aplicar en capas. En otro ejemplo, la membrana amniótica descelularizada se seca después de aplicar en capas, de modo que al menos dos de las membranas amnióticas descelularizadas estén en contacto mutuo.

La invención proporciona un injerto quirúrgico que comprende el biotejido de colágeno utilizado en la invención, laminados del mismo, andamiajes tridimensionales del mismo, o composiciones de hidrogel del mismo que resultan útiles en un contexto médico, dental y quirúrgico. De hecho, se espera que las composiciones de la invención tengan un aumento de la utilidad terapéutica y clínica con respecto a los otros biomateriales conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, los injertos quirúrgicos de la invención resultan útiles en un método de tratamiento y/o prevención de una enfermedad o trastorno relacionado con los ojos en un sujeto utilizando una composición de la invención. En una realización específica, los injertos quirúrgicos de la invención resultan útiles en un método de tratamiento y/o prevención de una enfermedad o trastorno relacionado con los ojos en un sujeto, que comprende aplicar el biotejido de colágeno sobre la superficie de un ojo enfermo del sujeto.

En otras realizaciones, los injertos quirúrgicos de la invención resultan útiles en un método de tratamiento y/o prevención de una condición de la piel en un sujeto, preferentemente un ser humano. En una realización específica, el método comprende poner en contacto la piel del sujeto con la composición. En otra realización específica, el injerto quirúrgico se aplica directamente sobre la superficie de la piel del sujeto, que es el sitio de la afección cutánea.

El injerto quirúrgico de la invención también resulta útil en un método de tratamiento de una herida o una quemadura en un sujeto, preferentemente un ser humano, que comprende poner en contacto el injerto quirúrgico en el sitio de la herida o quemadura.

La invención proporciona utilizar una composición de la invención que comprende dicho biotejido de colágeno y un laminado de membrana amniótica en un procedimiento quirúrgico, tal como cirugía oftálmica, cirugía cardiovascular, cirugía periodontal, cirugía neurológica, cirugía dental y cirugía ortopédica.

La invención comprende utilizar una composición de la invención para administrar una biomolécula, preferentemente un agente terapéutico en un sujeto, preferentemente un ser humano. La invención comprende además utilizar una composición de la invención para administrar células en un sujeto, preferentemente un ser humano, en el que la composición se ha llenado adicionalmente con células.

Biotejido de colágeno

La invención proporciona una composición y un injerto quirúrgico que comprende una membrana amniótica colagenosa, en la presente memoria denominada biotejido de colágeno de la invención. El biotejido de colágeno de la invención mantiene la integridad estructural de la membrana amniótica no tratada nativa, es decir, conserva la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas estructurales en sus composiciones, tales como colágeno, elastina y posiblemente fibronectina. De esta manera, el biotejido de colágeno de la invención está compuesto de las mismas proteínas estructurales que las membranas amnióticas nativas o no tratadas. Por lo tanto, el biotejido de colágeno que se desvela en el presente documento está formado por las mismas proteínas estructurales que las membranas amnióticas nativas o sin tratar.

Específicamente, la presente invención proporciona una composición y un injerto quirúrgico que comprende un biotejido de colágeno que comprende una membrana amniótica deshidratada, descelularizada y libre de sustrato (es decir, sin respaldo de filtro), de manera que la membrana amniótica presenta una estructura terciaria y cuaternaria nativa (ver la fig. 2A y B). La membrana amniótica deshidratada, descelularizada, y libre de sustrato de la invención es un biotejido translúcido de material uniforme, es decir, con una cantidad mínima o nula de células, con una apariencia tal como se muestra en la fig. 3, que comprende una lámina helicoidal alfa de triple hélice levógira de la matriz descelularizada (Véase, por ejemplo, Molecular Blology of the Cell, 1989, Alberts etal., ed., Garland Publishlng Inc., New York, NY).

El biotejido de colágeno de la invención puede tener su origen en la membrana amniótica de cualquier mamífero, por ejemplo, origen equino, bovino, porcino o catarrino, pero lo más preferentemente tiene su origen en placenta humana. En una realización preferente, el biotejido de la invención tiene la estructura terciaria y cuaternaria nativa del material de colágeno en su composición.

El biotejido de colágeno de la invención, en contraste con los que se describen en la técnica anterior, se manipula de

forma mínima, es decir, el biotejido de colágeno de la invención se somete como máximo a un tratamiento o manipulación química o biológica, por ejemplo, descelularización en un detergente débil. Tal como se usa en la presente memoria, "manipulado de forma mínima" se refiere a una falta de tratamiento enzimático, por ejemplo, tratamiento con proteasas, tratamiento con calor elevado, tratamiento químico agresivo, exposición a detergentes o ácidos fuertes, de la membrana amniótica de la invención en cualquier etapa durante la preparación del biotejido de colágeno. El tratamiento con proteasas de la membrana amniótica, como parte de la etapa de descelularización, compromete la integridad estructural del biotejido, por ejemplo, afecta a la estructura terciaria y/o cuaternaria del material de colágeno. La manipulación mínima de la membrana amniótica en la preparación del biotejido de la invención, por el contrario, da como resultado un producto con mayor resistencia mecánica y un producto translúcido con respecto a los de la técnica anterior.

El biotejido de colágeno descelularizado, libre de sustrato de la invención comprende colágeno (incluyendo, colágeno de tipo I, IV y II), así como fibronectina y elastina. Esta combinación es responsable en parte de la resistencia mecánica incrementada del biotejido de la invención, tal como se prepara de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria. Como resultado del procesamiento y manipulación mínimos, el biotejido de colágeno de la invención mantiene la composición de la membrana nativa. El colágeno es el material estructural principal de los vertebrados y está presente en tejidos de función principalmente mecánica. La molécula de colágeno consiste en tres cadenas de polipéptidos denominadas cadenas alfa (cada una de aproximadamente 1000 aminoácidos de longitud) entrelazadas entre sí al igual que en un acuerdo de tres hebras formando una superhélice levógira regular. Se han identificado al menos 19 tipos de colágeno y todos ellos poseen la misma organización tridimensional (Véase, por ejemplo, Lee et al., 2001, International J. of Pharmaceutics, 221: 1-22).

La membrana amniótica de la presente invención es superior en forma, biomecánica, y características estructurales a las informadas en la técnica anterior y conocidas por los inventores, en parte, en base al descubrimiento de un nuevo método de preparación de la membrana amniótica y una fuente controlada y abundante de placenta humana, tal como se describe en la presente memoria (Véase la Sección 5.2).

En particular, biotejido de colágeno de la presente invención tiene una o más de las siguientes características en comparación con una o más de las membranas amnióticas de la técnica anterior: resistencia a la tracción incrementada, capacidad de sutura superior, inmunogenicidad reducida que da como resultado una reducción de la respuesta de rechazo del huésped al injerto; facilidad de almacenamiento y transporte sin la necesidad de congelación ni crioconservación, requisitos mínimos de preparación posterior para manipulación y activación, es decir, rehidratación, procedimientos antes de su uso, y la capacidad para su almacenamiento a temperatura ambiente durante períodos de tiempo prolongados a la vez que se mantiene la integridad estructural y funcional. La Tabla 1 resumen las ventajas del biotejido de la invención en comparación con las de la técnica anterior.

Además, en la presente memoria se describe un biotejido de colágeno que comprende una membrana coriónica deshidratada, descelularizada, y libre de sustrato, preferentemente una membrana coriónica humana. Se espera que un biotejido de colágeno que comprende una membrana coriónica presente propiedades comparables a las del biotejido de colágeno de la invención que comprende una membrana amniótica. En la presente memoria se describen todas las formas médicamente útiles del biotejido de colágeno que comprende una membrana coriónica que incluye, aunque sin limitación, laminados, andamiajes tridimensionales y composiciones de hidrogel.

TABLA 1. Biotejidos de la invención frente a preparaciones tradicionales de membrana amniótica

CARACTERÍSTICA	BIOTEJIDO DE COLÁGENO DE LA INVENCIÓN	MEMBRANAS AMNIÓTICAS TRADICIONALES
Ensayos serológicos	COMPLETO: cribado de anticuerpos (ATY); cribado de alanina aminotransferasa (ALT), anticuerpo nuclear de la hepatitis (ácido nucleico y ELISA); antígeno de superficie de la hepatitis B (ácido nucleico y ELISA); anticuerpo del virus de la hepatitis C (ácido nucleico y ELISA); VIH-1 y VIH-2; VLTH-1 y VLTH-2; ensayo de la sífilis (RPR); ensayo de anticuerpos del CMV; ensayo de la hepatitis C y del VIH (ensayo de ácido nucleico).	INCOMPLETO: sin ensayo de CMV
Conservación	SECO: deshidratado con calor suave al vacío; sin necesidad de congelador o refrigeración;	CONGELADO: almacenado en medio de cultivo; requiere el transporte en hielo seco y congelador/nevera

	almacenamiento en estantería	
Preparación quirúrgica	MINUTOS: preparación en minutos; se hidrata directamente en el sitio de la cirugía, p.ej. En el ojo con gotas de solución salina; sin necesidad de descongelación, enjuagues o aclarados	LARGO; requiere un tiempo prolongado de preparación/descongelación/enjuague; debe retirarse el soporte de filtro
Manipulación quirúrgica	SIMPLE: puede recortarse en seco y aplicarse en el sitio quirúrgico y después hidratarse en el sitio	TEDIOSO: Debe retirarse del papel de filtro; tiende a «enrollarse» durante la cirugía; difícil de manipular quirúrgicamente
Celularidad	DESCELULARIZADO: cantidad mínima a nula de células epiteliales; cantidad mínima a nula de residuos celulares; remodelado más rápido	CON CÉLULAS MUERTAS: presencia de células muertas; la evidencia clínica sugiere un tiempo de cicatrización más largo/una tasa de rechazo más alta (evidencia anecdótica)
Sustrato	NO: libre de sustrato (p.ej., sin soporte de filtro)	SÍ: soportado sobre nitrocelulosa/papel de filtro
Esterilización (opcional)	Sí: radiación con haz de electrones; al menos 18 kGy; aumento de la garantía de seguridad del tejido	NO: almacenado en medios que contienen antibióticos y glicerol (tóxico); sin esterilización terminal adecuada
Claridad del tejido	TRANSLÚCIDO: ópticamente transparente	OPACO: aspecto lechoso o turbio

En una realización preferente, el biotejido de colágeno de la invención es translúcido, es decir, ópticamente transparente. En otra realización preferente, el biotejido de colágeno de la invención es delgado y ligero. En una realización específica, el biotejido de colágeno deshidratado de la invención es de 0,3 a 0,6 mg/cm^2. En una realización específica, el biotejido de colágeno de la invención presenta un grosor de al menos 30 micrómetros. En otra realización específica, el biotejido de colágeno de la invención tiene un espesor de aproximadamente 10 a 40 micrómetros.

La invención comprende el uso del biotejido de colágeno de la invención en diversas configuraciones, p.ej., inserciones, escudos. En general, el biotejido se puede configurar en cualquier forma médicamente útil. Por ejemplo, el biotejido de colágeno se puede configurar para uso en su totalidad, es decir, uso del biotejido de colágeno a partir de una placenta entera. Como alternativa, el biotejido de colágeno se puede cortar en tiras, parches o rollos, o se puede tejer en hilos. En otra realización, el biotejido de colágeno, en forma de una lámina o laminado de un solo espesor, se puede recortar a intervalos regulares y expandir para formar, por ejemplo, una malla.

En algunas realizaciones, el biotejido de colágeno plano, por ejemplo, tiene una superficie sin pendiente ni curvatura. En otras realizaciones, el biotejido de colágeno no es completamente plano y presenta una superficie texturada, p.ej., depresiones u hoyos en la superficie.

En una realización preferente específica, la invención comprende un laminado de membrana amniótica que comprende al menos dos capas del biotejido de colágeno de la invención. Las capas se pueden unir físicamente entre sí, por ejemplo a través del uso de un pegamento, fijaciones, o mediante estampado térmico de una parte de los biotejidos, por ejemplo, la periferia de al menos una de dichas capas, para fusionar las capas. Dado que el biotejido tiene un "grano", el biotejido se puede laminar en una diversidad de formas. En una realización, todas las capas de dicho laminado tienen la misma orientación del grano. En otra realización, al menos una de las capas está en una orientación del grano que está girada aproximadamente 90 grados (es decir, es aproximadamente perpendicular a) a la orientación del grano de al menos una de las otras capas. En una realización más específica, dichas capas perpendiculares son adyacentes entre sí. En todavía otra realización, dicho laminado comprende al menos tres capas del biotejido de colágeno, en el que las estructuras del grano de cada una de dichas al menos tres capas están giradas aproximadamente 60 grados con respecto a la estructura del grano de las dos capas restantes. En otra realización, dicho laminado contiene al menos un primer material y un segundo material, en el que dicho primer material es el biotejido de colágeno de la invención, y dicho segundo material es cualquier otra sustancia que puede formar un laminado con el biotejido de colágeno. En una realización específica, dicho segundo es una lámina o membrana derivada de una membrana distinta a la membrana amniótica. En otra realización específica, dicho segundo material es un material no natural, por ejemplo, polilactona, poliacetato o película de plástico. En algunas realizaciones, el laminado de membrana amniótica es una multicapa, que comprende al menos 6, al menos 8, al menos 10, al menos 20, al menos 80, al menos 100, al menos 1.000 membranas amnióticas que se han preparado de acuerdo con los

métodos descritos en la presente memoria. El laminado de membrana amniótica de la invención puede contener un número de capas ilimitado.

Los laminados tienen una rigidez estructural mayor que permite dar forma al laminado en estructuras tridimensionales complejas. Tales estructuras tridimensionales pueden incluir láminas, tubos, microesferas.

El biotejido de colágeno también se puede asociar a otro material, en una sola lámina o en forma de un laminado. Por ejemplo, el biotejido se puede asociar con, es decir, unir a, película de plástico flexible, gasa, láminas de plástico, endoprótesis vasculares, válvulas, dispositivos ortopédicos, vendajes, parches, etc.

El biotejido de colágeno puede comprender uno o más compuestos o sustancias que no forman parte de la matriz de colágeno del biotejido. Por ejemplo, el biotejido de colágeno se puede impregnar, durante la producción o durante la preparación para la cirugía, con una biomolécula. Tales biomoléculas incluyen pero no se limitan a, antibióticos (tales como clindamicina, minociclina, doxiciclina, gentamicina), hormonas, factores de crecimiento, agentes antitumorales, agentes antifúngicos, agentes antivirales, medicamentos para el dolor, antihistamínicos, agentes antiinflamatorios, agentes antiinfecciosos que incluyen, pero no se limitan a plata (tales como sales de plata, que incluyen, pero no se limitan a nitrato de plata y sulfadiazina de plata), plata elemental, antibióticos, enzimas bactericidas (tal como lisozoma), agentes de cicatrización de heridas (tales como citoquinas que incluyen, pero no se limitan a PDGF, TGF y timosina), ácido hialurónico como agente de cicatrización de heridas, selladores de heridas (tales como fibrina con o sin trombina), atrayentes celulares y reactivos de andamiajes (tales como fibronectina). En un ejemplo específico, el biotejido de colágeno se puede impregnar con al menos un factor de crecimiento, por ejemplo, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento del epitelio, etc. El biotejido también se puede impregnar con moléculas orgánicas pequeñas tales como inhibidores específicos de procesos bioquímicos particulares, por ejemplo, inhibidores de receptores de membrana, inhibidores de quinasas, inhibidores del crecimiento, fármacos anticáncer, antibióticos, etc.

En todavía otras realizaciones, el biotejido de colágeno de la invención se puede combinar con un hidrogel. Cualquier composición de hidrogel conocida por un experto en la materia está comprendida dentro de la invención, por ejemplo, cualquiera de las composiciones de hidrogel descritas en las siguientes revisiones: Graham, 1998, Med. Device Technol. 9 (1): 18-22; Peppas et al., 2000, Eur. J. Pharm. Biopharm. 50(1): 27-46; Nguyen et al., 2002, Biomaterials, 23(22): 4307-14; Henincl et al., 2002, Adv. Drug Deliv. Rev 54(1): 13-36; Skelhorne et al., 2002, Med. Device. Technol. 13(9): 19-23; Schmedlen et al., 2002, Biomaterials 23: 4325-32. En una realización específica, la composición de hidrogel se aplica en el biotejido de colágeno, es decir, se descarga en la superficie del biotejido de colágeno. La composición de hidrogel, por ejemplo, se puede pulverizar en el biotejido de colágeno, suturar en la superficie del biotejido, empapar con el biotejido de colágeno, bañar con el biotejido de colágeno o revestir sobre la superficie del biotejido de colágeno.

Los hidrogeles útiles en las composiciones de la invención se pueden preparar a partir de cualquier polímero interactivo con el agua o soluble en agua conocido en la técnica, que incluye, pero no se limita a, alcohol polivinílico (PVA), metacrilato de polihidroxietilo, polietilenglicol, polivinilpirrolidona, ácido hialurónico, dextrano o derivados y análogos de los mismos.

En algunas realizaciones, el biotejido de colágeno de la invención está impregnado adicionalmente con una o más biomoléculas antes de su combinación con un hidrogel. En otras realizaciones, la composición de hidrogel está impregnada adicionalmente con una o más biomoléculas antes de su combinación con un biotejido de colágeno de la invención. Tales biomoléculas incluyen pero no se limitan a, antibióticos (tales como clindamicina, minociclina, doxiciclina, gentamicina), hormonas, factores de crecimiento, agentes antitumorales, agentes antifúngicos, agentes antivirales, medicamentos para el dolor, antihistamínicos, agentes antiinflamatorios, agentes antiinfecciosos que incluyen, pero no se limitan a plata (tales como sales de plata, que incluyen, pero no se limitan a nitrato de plata y sulfadiazina de plata), plata elemental, antibióticos, enzimas bactericidas (tal como lisozima), agentes de cicatrización de heridas (tales como citoquinas que incluyen, pero no se limitan a PDGF, TGF y timosina), ácido hialurónico como agente de cicatrización de heridas, selladores de heridas (tales como fibrina con o sin trombina), atrayentes celulares y reactivos de andamiajes (tales como fibronectina). En un ejemplo específico, el biotejido de colágeno o composición de hidrogel se puede impregnar con al menos un factor de crecimiento, por ejemplo, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento del epitelio, etc. Preferentemente, la biomolécula es un agente terapéutico.

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

La composición de biotejido de hidrogel/colágeno presenta utilidad en el campo médico, incluyendo el tratamiento de heridas, quemaduras y afecciones cutáneas (p.ej., para tratar la cicatrización), usos cosméticos (p.ej., cirugía cosmética) y cualquier uso como implante. En algunas realizaciones, la composición de biotejido de hidrogel/colágeno se aplica por vía tópica en un sujeto, es decir, sobre la superficie de la piel, por ejemplo, para el tratamiento de una herida. En otras realizaciones, la composición de biotejido de hidrogel/colágeno se puede usar en el interior de un sujeto, por ejemplo en forma de un implante, para que llegue a ser una estructura permanente o semipermanente en el organismo. En algunas realizaciones, las composiciones de hidrogel se formulan para que no sean biodegradables. En todavía otras realizaciones, la composición de hidrogel se formula para que sea biodegradable. En una realización específica, la composición de hidrogel se formula para que se degrade en días. En otra realización específica, la

composición de hidrogel se degrada en meses.

En algunas realizaciones, el biotejido de colágeno de la invención se llena con células, de modo que las células sean uniformes y confluyentes. Entre las células que se pueden usar para llenar un biotejido de la invención incluyen, aunque sin limitación, células madre, preferentemente células madre humanas, células adultas diferenciadas humanas, células madre totipotentes, células madre pluripotentes, células madre multipotentes, células madre específicas de tejidos, células madre de tipo embrionario, células precursoras comprometidas y células fibroblastoides. En otras realizaciones, la invención comprende el biotejido de la invención lleno con clases específicas de células progenitoras, incluyendo condrocitos, hepatocitos, células hematopoyéticas, células parenquimatosas pancreáticas, neuroblastos y células progenitoras musculares. Las células para uso no se derivan de embriones humanos.

Procedimiento para producir biotejidos de colágeno (que no forma parte de la invención)

En la presente memoria se describe un método para preparar un biotejido de colágeno de la invención. En particular, en el presente documento se desvela un método para preparar un biotejido de colágeno que comprende: proporcionar una placenta, que comprende una membrana amniótica y una membrana coriónica; separar la membrana amniótica de la membrana coriónica; y descelularizar la membrana amniótica. En un ejemplo, el método implica adicionalmente el lavado y secado de la membrana amniótica descelularizada.

Preferentemente, la placenta es de origen humano para uso en sujetos humanos. En algunos ejemplos, en la presente memoria se describe una placenta de una especie animal para uso en un sujeto humano. En otros ejemplos descritos en la presente memoria, es una placa de una especie animal para uso veterinario en sujetos animales.

En un ejemplo, la placenta para uso en los métodos descritos en la presente memoria se obtiene tan pronto como resulte posible después del parto del recién nacido. En todavía otro ejemplo, la placenta se extrae inmediatamente después del parto por cesárea de un bebé sano normal. La condición es que la placenta se extraiga bajo condiciones asépticas. En algunos casos, la placenta se almacena durante 48 horas desde el momento del parto antes de cualquier tratamiento adicional. En otros casos, la placenta se almacena durante un máximo de 5 días desde el momento del parto antes de cualquier tratamiento adicional.

Preferentemente, la placenta, cordón umbilical, y sangre del cordón umbilical se transportan desde el quirófano o sala de partos a otra ubicación, por ejemplo, un laboratorio para su procesamiento adicional. La placenta se transporta preferentemente en un dispositivo estéril para transporte tal como una bolsa o un recipiente estéril, que opcionalmente se aísla térmicamente. En algunos casos, la placenta se almacena a temperatura ambiente hasta el tratamiento adicional. En otros casos, la placenta se refrigera hasta el tratamiento adicional, es decir, se almacena a una temperatura de aproximadamente 2ºC a 8°C. En todavía otras realizaciones, la placenta se almacena bajo condiciones estériles durante un máximo de 5 días antes del tratamiento adicional. En otro ejemplo, la placenta se manipula y se procesa bajo condiciones asépticas, tal como es conocido por el experto en la materia. El laboratorio está equipado preferentemente equipado con un sistema de filtración con HEPA (tal como se define mediante la clasificación de habitación limpia, que tiene una clase de 1.000 o superior). En un ejemplo, el sistema de filtración con HEPA se enciende al menos 1 hora antes del uso de la habitación de laboratorio para llevar a cabo los métodos dados a conocer en la presente memoria.

En determinadas realizaciones, se lleva a cabo la exsanguinación de la placenta, es decir, se drena completamente de la sangre del cordón umbilical que queda tras el nacimiento. En algunas realizaciones, la exsanguinación de la placenta se realizó al 70%, al 80%, al 90%, al 95% o al 99%.

El método comprende el cribado de la madre gestante antes del momento del nacimiento, usando técnicas convencionales conocidas por el experto en la materia, para enfermedades transmisibles, entre ellas, aunque sin limitación, VIH, VHB, VHC, VLHT, sífilis, CMV, y otros patógenos víricos que es conocido que contaminan el tejido de la placenta. Preferentemente, los métodos usados para identificar sistemáticamente una enfermedad de transmisión siguen el reglamento tal como lo establece la Federal Drug Administration. La madre gestante se puede cribar (por ejemplo, se extrae una muestra de sangre con fines diagnósticos) al mes del nacimiento, preferentemente a los dos meses del nacimiento, todavía más preferentemente a la semana del nacimiento, y lo más preferentemente, en el momento del nacimiento. Solamente se usan tejidos recogidos de donantes cuyas madres dieron negativo o no reactivo a los patógenos que se han mencionado anteriormente para producir un biotejido de la invención. Preferentemente, se obtiene una historia minuciosa paterna y médica y social detonante de la membrana de la placenta, que incluye, por ejemplo, una historia familiar detallada.

El donante se criba usando ensayos serológicos y bacteriológicos convencionales usados por el experto en la materia. Cualquier ensayo o prueba diagnóstica que identifique el patógeno o patógenos se encuentra comprendido dentro del alcance del método descrito en la presente memoria, aunque son ensayos preferentes los que combinan una alta precisión con la capacidad de un rendimiento elevado. En un ejemplo, el método comprende cribar el donante utilizando técnicas estándares conocidas por el experto en la materia para antígenos y/o anticuerpos. Un ejemplo no limitativo de antígenos y anticuerpos incluye: cribado de anticuerpos (ATY); cribado de alanina aminotransferasa (ALT); anticuerpo nuclear de la hepatitis (ácido nucleico y ELISA); antígeno de superficie de la hepatitis B; anticuerpo del virus de la hepatitis C; VIH-1 y VIH-2; VLHT-1 y VLHT-2; ensayo de sífilis (RPR); ensayo de anticuerpos del CMV; y

ensayo de la hepatitis C y VIH. Los ensayos usados pueden ser ensayos basados en ácidos nucleicos o ensayos basados en ELISA tal como lo conoce un experto en la materia.

El método comprende adicionalmente el ensayo de la sangre del cordón umbilical del recién nacido usando técnicas convencionales conocidas por el experto en la materia (véase, por ejemplo, Cotorruelo et al., 2002, Clin Lab. 48(5-6):271-81; Maine et al., 2001, Expert Rev. Mol. Diagn.,1(1):19-29; Nielsen et al., 1987, J. Clin. Microbiol. 25(8):1406-10). En un ejemplo, la sangre del cordón umbilical del recién nacido se somete a ensayo para patógenos bacterianos (incluyendo bacterias Gram-positivas y Gram-negativas) y hongos usando técnicas convencionales conocidas para el experto en la materia. El grupo sanguíneo y el factor Rh de la sangre del cordón umbilical del recién nacido se determina usando técnicas convencionales conocidas por el experto en la materia. Además, se obtiene CBC con diferenciar a partir de la sangre del cordón umbilical del recién nacido usando métodos convencionales conocidos por el experto en la materia. En todavía otra realización, se realiza un cultivo de bacterias aeróbicas a partir de la sangre del cordón umbilical del recién nacido, usando métodos convencionales conocidos por el experto en la técnica. Solamente se usan tejidos recogidos de donantes que tienen un CBC dentro de un límite normal (por ejemplo, ninguna anomalía ni desviación gruesa respecto del nivel normal), ensayo negativo para serología y bacteriología, y ensayo negativo o no reactivo para enfermedad infecciosa y contaminación para producir un biotejido de la invención.

Un método ejemplar de preparación de un biotejido de colágeno de la invención comprende las siguientes etapas.

Etapa I. El procesamiento de la membrana placentaria se lleva a cabo de manera que se separa el cordón umbilical del disco placentario (opcionalmente) y se separa la membrana amniótica de la membrana coriónica. En un ejemplo preferente, la membrana amniótica se separa de la membrana coriónica antes de cortar la membrana de la placenta. La separación de la membrana amniótica de la membrana coriónica se realiza preferentemente comenzando en el borde de la membrana de la placenta. En otro ejemplo, la membrana amniótica se separa de la membrana coriónica usando la disección roma, por ejemplo, con dedos enguantados. Después de la separación de la membrana amniótica respecto de la membrana coriónica y del disco placentario, el tronco del cordón umbilical se corta por ejemplo, con tijeras, y se separa del disco placentario. En determinados ejemplos, cuando no resulta posible la separación de las membranas amniótica y coriónica sin romper el tejido, el método comprende el corte de las membranas amniótica y coriónica a partir del disco placentario como un solo trozo y a continuación desprenderlas, separándolas.

A continuación, la membrana amniótica se almacena preferentemente en una solución salina estéril. En algunos ejemplos, la solución salina estéril está tamponada. En un ejemplo preferente, la solución salina estéril para almacenar la membrana amniótica es una solución de NaCl al 0,9 % estéril. Preferentemente, la membrana amniótica se almacena por refrigeración, a una temperatura de al menos 4°C. En determinados casos, la membrana amniótica se refrigera a una temperatura de al menos 2°C, al menos 6°C, o de hasta 8°C. En este punto, la membrana amniótica se puede almacenar hasta 5 días, con la condición de que se refrigere y que se conserve cubiertas con solución salina estéril. Preferentemente, la membrana amniótica separada se refrigera durante un máximo de 72 horas desde el momento del parto antes de la siguiente etapa del proceso.

Etapa II. Una vez que la membrana amniótica ha sido separada de la membrana coriónica, el método comprende la descelularización de la membrana amniótica. Cualquier procedimiento de descelularización conocido por el experto en la materia está comprendido en los métodos de la descripción, con la condición de que el procedimiento para descelularizar la membrana amniótica no incluya ninguna congelación de la membrana amniótica. Tal como se usa en la presente memoria, descelularizar se refiere a retirar todo el material celular y residuos celulares (por ejemplo, todo el material celular y residuos celulares visibles) respecto de las membranas amnióticas de la invención. La descelularización de la membrana amniótica asegura que se retiran básicamente todas las células asociadas normalmente con la matriz de colágeno de la membrana amniótica. La descelularización de la membrana amniótica de la Invención que retira "básicamente todas" las células asociadas con la matriz de colágeno retiran preferentemente al menos un 90% de las células, más preferentemente retira al menos un 95% de las células, y lo más preferentemente, retira al menos un 99% de las células. Las membranas amnióticas descelularizadas de acuerdo con los métodos de la descripción son delgadas de forma uniforme, es decir, de 10-40 micrómetros de grosor, lisas (tal como se determina al tacto) y de aspecto transparente.

En un ejemplo, la descelularización de la membrana amniótica de la invención comprende retirar sustancialmente todo el material celular material y residuos celulares del lado materno de la membrana amniótica seguido de retirada de todo el material celular y residuos celulares del lado fetal de la membrana amniótica. En una realización específica, la descelularización de la membrana amniótica de la invención comprende el raspado físico en combinación con el enjuague con una solución estéril. En otro ejemplo, el raspado físico de la membrana amniótica comprende el raspado con un raspador de células estéril. En todavía otro ejemplo, la solución estéril para enjuagar la membrana amniótica durante la descelularización es una solución acuosa, una solución que comprende un tampón fisiológico o una solución salina tal como por ejemplo una solución de NaCl al 0,9%.

La descelularización de la membrana amniótica comprende la retirada de células nativas y otros antígenos y residuos celulares de la membrana amniótica, y, opcionalmente, el tratamiento para inhibir la generación de nuevos sitios inmunológicos. Al descelularizar la membrana amniótica, se retiran células viables nativas, así como otras estructuras o componentes celulares y acelulares que pueden provocar una respuesta inmune adversa. La técnica de descelularización usada no debería dar como resultado una alteración gruesa de la anatomía de la membrana

amniótica ni alterar las propiedades biomecánicas de su composición estructural, es decir, la integridad estructural y bioquímica del colágeno, elastina, y posiblemente fibronectina no resultan afectadas por la descelularización. Específicamente, el tratamiento químico agresivo y tratamiento con proteasas de la membrana amniótica no se encuentran comprendidas dentro del alcance de la técnica de descelularización descrita en la presente memoria.

Preferentemente, la descelularización de la membrana amniótica comprende el uso de una solución que contiene detergente. Entre los detergentes que se pueden usar de acuerdo con los métodos de la presente invención se incluyen, detergentes no iónicos, Tritón X-100, detergentes aniónicos y dodecil sulfato sódico. Los detergentes pueden utilizarse solos o en combinación en los métodos descritos en la presente memoria. Cualquier detergente aniónico suave, es decir, un detergente no cáustico, con un pH de 6 a 8, y baja formación de espuma, se puede usar de acuerdo con los métodos de la descripción. En un ejemplo, se usa monohidrato de la sal sódica del ácido desoxicólico al 0,01-1% en la descelularización de la membrana amniótica. Aunque sin pretender limitarse a ningún modo de acción en particular, la descelularización de la membrana amniótica de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria puede alterar las membranas celulares y ayudar en la retirada de los residuos celulares de la membrana amniótica. Sin embargo, se deberían realizar etapas para eliminar cualquier nivel de detergente residual en la membrana amniótica, con el fin de, por ejemplo, evitar interferencias con la repoblación posterior de la membrana amniótica con células viables.

Resulta esencial limitar la actividad de proteasa en la preparación del biotejido de la invención. Aditivos tales como agentes quelantes de iones metálicos, por ejemplo 1,10-fenantrolina y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), crean un entorno desfavorable para muchas enzimas proteolíticas. La provisión de condiciones subóptimas para proteasas tales como colagenasa, puede ayudar a la protección de las composiciones de membrana amniótica tales como colágeno de la degradación durante la etapa de lisis. Se pueden conseguir condiciones subóptimas para las proteasas mediante la formulación de la solución de lisis hipotónica para eliminar o limitar la cantidad de iones de calcio y cinc disponibles en la solución. Muchas proteasas son activas en presencia de iones de calcio y cinc y pierden una gran parte de su actividad en entornos libres de iones de calcio y cinc. Preferentemente, la solución de lisis hipotónica se preparará seleccionando condiciones de pH, reducción de la disponibilidad de iones de calcio y cinc, presencia de agentes quelantes de iones metálicos y el uso de inhibidores proteolítica específicos para colagenasas de modo que la solución Usará de forma óptima las células nativas a la vez que se protege la membrana amniótica subyacente de la degradación proteolítica adversa. Por ejemplo, una solución de lisis hipotónica puede incluir una solución tamponada de agua, pH 5,5 a 8, preferentemente pH 7 a 8, libre de iones de calcio y cinc y que incluye un agente quelante de ion metálico tal como EDTA. Además, también se pueden usar parámetros de control de temperatura y tiempo durante el tratamiento de la membrana amniótica con la solución de lisis hipotónica para limitar la actividad de las proteasas.

Es preferente que el tratamiento de descelularización de la membrana amniótica también limite la generación de nuevos sitios inmunológicos. Debido a que se considera que la degradación enzimática del colágeno conduce a un aumento de la inmunogenicidad, el método comprende el tratamiento de la membrana amniótica con enzimas, por ejemplo, nucleasas, que resultan eficaces para inhibir el metabolismo celular, la producción de proteínas y la división celular, que minimizan la proteólisis de las composiciones de la membrana amniótica conservando de este modo la arquitectura subyacente de la membrana amniótica. Ejemplos de nucleasas que se pueden usar de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria resultan eficaces en la digestión del ADN y ARN celulares nativos, incluyendo tanto exonucleasas como endonucleasas. Un ejemplo no limitante de nucleasas que se pueden usar de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria incluye exonucleasas que inhiben la actividad celular, por ejemplo, ADNasa I (SIGMA Chemical Company, St.Louis, Mo.) y ARNasa A (SIGMA Chemical Company, St. Louis, Mo.) y endonucleasas que inhiben la actividad celular, por ejemplo, EcoRI (SIGMA Chemical Company, St.Louis, Mo.) y Hind III (SIGMA Chemical Company, St. Louis, Mo.). Resulta preferible que las nucleasas seleccionadas se apliquen en una solución de tampón fisiológico que contiene iones, por ejemplo, magnesio, calcio, que resultan óptimas para la actividad de la nucleasa. Preferiblemente, la concentración iónica de la solución tamponada, la temperatura de tratamiento y la duración del tratamiento son seleccionadas por el experto en la materia mediante experimentación rutinaria para garantizar el nivel deseado de actividad de nucleasa. El tampón es preferentemente hipotónico para estimular el acceso de las nucleasas a Interiores celulares.

En otro ejemplo, la descelularización de la membrana amniótica descrita en la presente memoria comprende las etapas siguientes. En primer lugar, la membrana amniótica se transfiere a un recipiente estéril limpio, y opcionalmente se aclara con agua estéril y se seca con gasa estéril. A continuación, el amnios se coloca en una bandeja estéril con el lado materno colocado hacia arriba. Usando un raspador de células estéril (por ejemplo, de 32 cm, cuchilla PE, mango PS, NalgeNunc International), el amnios se descelulariza parcialmente por retirada física de todo el material celular visible desde el lado materno de la membrana amniótica. Se usa agua estéril para ayudar en la retirada de las células y de los residuos celulares, si fuera necesario. Después de finalizar la descelularización parcial en el lado materno de la membrana amniótica, se da la vuelta a la membrana amniótica de modo que las caras del lado fetal están hacia arriba. Todos los restos celulares visibles en el lado fetal se retiran suavemente con un raspado de células usando una presión mínima en la membrana amniótica para evitar el desgarro. Se puede usar agua estéril para ayudar en la retirada de las células y de los residuos.

En un ejemplo, la membrana amniótica descelularizada se introduce en un envase estéril lleno de una solución fisiológica estéril, por ejemplo, solución de NaCl al 0,9% estéril, antes de su procesamiento adicional. La siguiente etapa de procesamiento de la membrana amniótica debería iniciarse no después de 2-3 horas después de la

introducción de la membrana amniótica en la solución fisiológica estéril. En un ejemplo específico, en el caso en que la etapa III sigue inmediatamente a la etapa II, no resulta necesario introducir la membrana amniótica en un recipiente con solución estéril.

La membrana amniótica se puede cortar durante el proceso de lavado, usando por ejemplo un bisturí estéril, para darle forma para un lavado más fácil o para retirar las zonas que no se pueden limpiar.

Etapa III. Después de la descelularización, la membrana amniótica se lava para asegurar la retirada de residuos celulares que pueden incluir proteínas celulares, lípidos celulares, y ácidos nucleicos celulares, así como cualquier residuo extracelular tal como proteínas solubles extracelulares, lípidos y proteoglicanos. Aunque no se pretende quedar ligado por ningún mecanismo de acción, la retirada de este residuo celular y extracelular reduce la inmunogenicidad de la membrana amniótica.

Una vez que las membranas amnióticas de la invención han sido descelularizadas, las membranas se lavan adicionalmente con el fin de conseguir de forma eficaz la retirada completa de todo el material celular visible y residuos celulares de ambos lados de la membrana amniótica. La solución es preferentemente una solución hipotónica acuosa o de baja fuerza Iónica formulada para lisar de forma eficaz las células de tejido nativo. Tal solución hipotónica acuosa puede ser agua desionizada o un tampón hipotónico acuoso. Preferentemente, el tampón hipotónico acuoso contiene adicionalmente aditivos que proporcionan condiciones subóptimas para la actividad de las proteasas, por ejemplo colagenasa, que se pueden liberar como resultado de la lisis celular.

Preferentemente, la membrana amniótica se agita suavemente en el detergente, por ejemplo, en una plataforma oscilante, para ayudar en la descelularización. En determinados ejemplos, la membrana amniótica se agita durante al menos 15 minutos, al menos 20 minutos, al menos 30 minutos, o hasta 120 minutos. La membrana amniótica, después de la descelularización con detergente, se puede descelularizar físicamente de nuevo tal como se ha indicado anteriormente; las etapas de descelularización física y con detergente se pueden repetir cuando sea necesario, siempre y cuando se mantenga la Integridad de la membrana amniótica, hasta que no quede material celular ni residuos celulares visibles.

En un ejemplo específico, el lavado de la membrana amniótica comprende las siguientes etapas: la membrana amniótica descelularizada se introduce en un recipiente estéril que a continuación se llena con una solución de descelularización en una cantidad suficiente para cubrir la membrana amniótica; el recipiente con la membrana amniótica y la solución de descelularización a continuación se colocan en una plataforma oscilante (por ejemplo, modelo 100, VWR Scientific Products Corp., P.O. Box 640169, Pittsburgh, PA 15264-0169). La membrana amniótica en la solución de descelularización a continuación se agita entre 15 minutos y 120 minutos en la plataforma oscilante. Después de la etapa de agitación, la membrana amniótica se retira del recipiente y se introduce en una bandeja estéril limpia llena con una solución estéril, por ejemplo, solución de NaCl al 0,9%. Usando un nuevo raspador celular estéril, se retira la solución de descelularización residual y se retira cualquier material celular restante de ambos lados de la membrana amniótica. Esta etapa se puede repetir tantas veces como sea necesario para retirar todo el material celular residual visible de ambos lados de la membrana amniótica.

En determinadas realizaciones, la membrana amniótica se seca Inmediatamente (es decir, en 30 minutos) después de la etapa de descelularización. Alternativamente, cuando el procesamiento adicional no se realiza inmediatamente, la membrana amniótica se puede refrigerar, por ejemplo, almacenarse a una temperatura de 2-8°C, durante un máximo de 28 días antes del secado. Cuando la membrana amniótica descelularizada se almacena durante más de tres días pero menos de 28 días, la solución estéril que cubre la membrana amniótica se cambia preferentemente de forma periódica, por ejemplo, cada 1-3 días.

En determinados ejemplos, cuando la membrana amniótica no se refrigera después del lavado, la membrana amniótica se lava al menos 3 veces antes de pasar a la etapa IV de la preparación. En otros ejemplos, cuando la membrana amniótica se ha refrigerado y la solución estéril se ha cambiado una vez, la membrana amniótica se lava al menos dos veces antes de pasar a la etapa IV de la preparación. En todavía otros ejemplos, cuando la membrana amniótica se ha refrigerado y la solución estéril se ha cambiado dos veces o más, la membrana amniótica se lava al menos una vez antes de pasar a la etapa IV de la preparación.

En algunos ejemplos, la membrana amniótica descelularizada se almacena bajo condiciones estériles y no se lleva a cabo ningún procesamiento adicional, es decir, ningún secado. Antes de pasar a la etapa IV, resulta esencial que todos los ensayos bacteriológicos y serológicos sean evaluados para garantizar que todos los ensayos eran negativos.

Etapa IV. La etapa final del método descrito en la presente memoria comprende secar la membrana amniótica descelularizada de la invención para producir el biotejido de colágeno. Se puede usar cualquier método de secado de la membrana amniótica con el fin de producir una lámina de colágeno plana, seca. Preferentemente, sin embargo, la membrana amniótica se seca al vacío.

Un método ejemplar para secar la membrana amniótica descelularizada de la invención comprende las siguientes etapas:

ensamblaje de la membrana amniótica descelularizada para el secado. La membrana amniótica descelularizada se

retira de la solución estéril, y el exceso de fluido se aprieta suavemente. La membrana amniótica descelularizada se estira suavemente a continuación hasta que está plana con el lado fetal con la cara en una posición hacia abajo, por ejemplo, en una bandeja. A continuación, se da la vuelta a la membrana amniótica descelularizada de modo que el lado fetal tiene la cara hacia arriba, y se coloca en un marco de secado, preferentemente un marco de secado de malla de plástico (por ejemplo, Qulck Count® Plástic Canvas, Unlek, Inc., Waunakee, WI). El marco de secado puede ser una malla de acero inoxidable esterilizable en autoclave. Preferiblemente, aproximadamente 0,5 centímetros de la membrana amniótica solapan los bordes del marco de secado. En determinados casos, la superposición de la membrana amniótica que se extiende más allá del marco de secado se envuelve sobre la parte superior del marco, por ejemplo, usando un elemento de sujeción o un hemóstato. Una vez que la membrana amniótica se ha posicionado sobre el marco de secado, se aplica una gasa estéril sobre la plataforma de secado de un secador de calor (o secador de gel) (por ejemplo, el modelo 583, Bio-Rad Laboratories, 200 Alfred Nobel Drive, Hercules, CA 94547), de modo que se cubra una superficie ligeramente superior que la de membrana amniótica que descansa en el marco de secado de malla de plástico. Preferentemente, el espesor total de la capa de gasa no supera el espesor de una pasa de 4 x 4 doblada. Se puede usar cualquier aparato de secado con calor que sea adecuado para el secado del material de tipo lámina. El marco de secado se aplica en la parte superior de la gasa en la plataforma de secado de modo que los bordes del marco de plástico se extienden por encima y más allá de los bordes de la gasa, preferentemente entre 0,1-1,0 cm, más preferiblemente 0,5-1,0 cm. En otro ejemplo, el marco de secado con la membrana amniótica se aplica sobre la parte superior de la gasa estéril con la cara fetal de la membrana amniótica encarada hacia arriba. En algunos casos, el marco de malla de plástico se aplica sobre la membrana amniótica. En algunas realizaciones, otra malla de marco de plástico se coloca en la parte superior de la membrana amniótica. 4. En otro ejemplo, una lámina de plástico fino (por ejemplo, SW 182, PVC transparente, AEP Industries Inc., South Hackensack, NJ 07606) o una silicona biocompatible se aplica en la parte superior de la malla cubierta con membrana de modo que la lámina se extiende más allá de todos los bordes. En este caso, el segundo marco de malla no resulta necesario.

En un ejemplo alternativo, se aplica la membrana amniótica una o más láminas estériles de material Tyvek (por ejemplo, una lámina de Tyvek para envasado médico, Dupont Tyvek®, P.O. Box 80705, Wilmington, DE 19880- 0705), opcionalmente, con una lámina de Tyvek en la parte superior de la membrana (antes de aplicar la lámina de plástico). Este procedimiento alternativo producirá una versión más lisa del biotejido (es decir, sin el patrón de regiones de compresión de fibra diferencial a lo largo y perpendicularmente al eje del material), que puede resultar ventajoso para determinadas aplicaciones, tales como, por ejemplo, para uso como una matriz para la expansión de células, tal como se describe en la presente memoria.

Secado de la membrana amniótica. En algunos ejemplos, el método comprende el secado con calor de la membrana amniótica de la invención al vacío. Aunque el secado al vacío se puede conseguir a cualquier temperatura de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 60 °C, la membrana amniótica se seca preferentemente entre aproximadamente 35 °C y aproximadamente 50 °C, y lo más preferentemente a aproximadamente 50 °C. Se debería observar que se espera una cierta degradación del colágeno a temperaturas superiores a 50 °C. La temperatura de secado se ajusta preferentemente y se verifica usando un termómetro digital calibrado usando una sonda extendida. Preferentemente, la presión de vacío se ajusta a aproximadamente -559 mm (-22 pulgadas) de Hg. La etapa de secado continúa hasta que la matriz de colágeno de la membrana amniótica contiene menos de un 3-12 % de agua tal como se determina, por ejemplo, con un analizador de humedad. Para llevar a cabo esto, la membrana amniótica se puede secar al vacío con calor, por ejemplo, durante aproximadamente 60 minutos para conseguir una membrana amniótica deshidratada. En algunos ejemplos, la membrana amniótica se seca durante aproximadamente 30 minutos a 2 horas, preferiblemente durante aproximadamente 60 minutos. Aunque no se pretende quedar ligado por ningún mecanismo de acción, se cree que del ajuste de calor bajo acoplado con presión de vacío permite que la membrana amniótica consiga el estado deshidratado sin desnaturalizar el colágeno.

Después de la finalización del procedimiento de secado, la membrana amniótica se enfría durante aproximadamente dos minutos con la bomba de vacío funcionando.

Envasado y almacenamiento de la membrana amniótica. Una vez se ha secado la membrana amniótica, se levanta suavemente la membrana separándola del marco de secado. El "levantado" de la membrana puede comprender las siguientes etapas: aunque la bomba todavía esté funcionando, la película de plástico se retira suavemente de la membrana amniótica comenzando en la esquina, a la vez que se mantiene la membrana amniótica debajo; el marco con la membrana amniótica se despega de la plataforma de secado y se coloca en una tabla para cortar con la cara de la membrana amniótica mirando hacia arriba; se hace una incisión, cortando a lo largo del borde 1-2 mm más allá del borde del marco; a continuación la membrana amniótica se retira del marco; y se corta en tamaños apropiados tal como lo determine su uso posterior. Preferentemente, la manipulación de la membrana amniótica en esta etapa se realiza con guantes estériles.

La membrana amniótica se introduce en un recipiente estéril, por ejemplo, una bolsa abrefácil, y se cierra herméticamente. El biotejido producido de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria se puede almacenar a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo prolongado tal como se ha indicado anteriormente.

En la presente memoria se describe un método para preparar un biotejido de colágeno que comprende una membrana coriónica. Se espera que los métodos que se han descrito anteriormente se puedan aplicar en el método para preparar un biotejido que comprende una membrana coriónica. Además, en la presente memoria se describe un método para

preparar un biotejido de colágeno que comprende: proporcionar una placenta, que comprende una membrana amniótica y una membrana coriónica; separar la membrana amniótica de la membrana coriónica; y descelularizar la membrana amniótica. En un ejemplo específico, el método comprende además lavar y secar la membrana coriónica descelularizada.

Métodos para preparar andamiajes y laminados tridimensionales (que no forman parte de la invención)

En la presente memoria se describen métodos para preparar andamiajes tridimensionales, configuraciones y laminados tridimensionales que comprenden el biotejido de colágeno de la invención.

En la presente memoria se describe un método para preparar un laminado de membrana amniótica que comprende: proporcionar una placenta, preferentemente una placenta humana, que comprende una membrana amniótica y una membrana coriónica, separar la membrana amniótica de la membrana coriónica, usando métodos descritos en la presente memoria; descelularizar la membrana amniótica, usando métodos descritos en la presente memoria; lavar la membrana amniótica descelularizada al menos una vez usando métodos descritos en la presente memoria; formar capas de al menos dos de las membranas amnióticas descelularizadas en contacto entre sí de modo que se forma el laminado de membrana amniótica; y secar el laminado de membrana amniótica, usando métodos descritos en la presente memoria.

Alternativamente, el método para preparar un laminado de membrana amniótica comprende secar al menos dos membranas amnióticas preparadas y aplicar en capas las dos o más membranas amnióticas en contacto mutuo, de manera que se forma un laminado de membranas amnióticas.

Las capas de membrana amniótica producidas de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria se pueden colocar en contacto mutuo en presencia de un adhesivo para formar un laminado de membrana amniótica. El adhesivo usado de acuerdo con los métodos descritos y las composiciones de la invención puede ser cualquier pegamento biológico conocido por el experto en la materia, preferentemente un adhesivo biocompatible, incluyendo un adhesivo natural, por ejemplo, fibronectina, fibrina o pegamento sintético. Las capas de membrana amniótica preparadas de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria se entrecruzan entre sí para formar un laminado de membrana amniótica. Cualquier reactivo y método de entrecruzamiento conocido por el experto en la materia se encuentra comprendido dentro del alcance de la presente exposición, incluyendo el entrecruzamiento químico, el entrecruzamiento por radiación, el entrecruzamiento con fibronectina, el entrecruzamiento con fibrinógeno y el entrecruzamiento con hidrogel. En otros ejemplos, los laminados de membrana amniótica producidos de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria no comprenden un adhesivo.

Almacenamiento y manipulación del biotejido de colágeno (que no forma parte de la invención)

En la presente memoria se describen medios de almacenamiento del biotejido de colágeno como láminas deshidratadas a temperatura ambiente (p.ej., 25ºC). En determinados ejemplos, el biotejido de colágeno de la invención se puede almacenar a una temperatura de al menos 10°C, de al menos 15°C, de al menos 20°C, de al menos 25°C, o de al menos 29°C. Preferiblemente, el biotejido de colágeno de la invención no está refrigerado. El biotejido de colágeno de la invención se puede refrigerar a una temperatura de aproximadamente 2 a 8°C. Además, el biotejido de colágeno de la invención se puede almacenar a cualquiera de las temperaturas anteriormente identificadas durante un periodo de tiempo prolongado. El biotejido de la invención puede almacenarse bajo condiciones estériles y no oxidantes. El biotejido producido de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria se puede almacenar a cualquiera de las temperaturas especificadas durante 12 meses o más sin alteración de la integridad bioquímica o estructural (por ejemplo, sin degradación), sin ninguna alteración de las propiedades bioquímicas o biofísicas del biotejido de colágeno. El biotejido producido de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria se puede almacenar durante varios años sin alteración de la integridad bioquímica o estructural (por ejemplo, sin degradación), sin ninguna alteración de las propiedades bioquímicas o biofísicas del biotejido de colágeno. Se espera que el biotejido de la invención preparado de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria presente una duración indefinida. El biotejido se puede almacenar en cualquier recipiente adecuado para almacenamiento a largo plazo. Preferentemente, el biotejido de colágeno de la invención se almacena en un envase de bolsa para pelar doble estéril.

En la presente memoria se describen medios de manipulación del biotejido de colágeno de la invención en su estado seco. El biotejido de colágeno puede recortarse antes del uso, por ejemplo antes del uso como injerto quirúrgico. La invención incluye cualquier dimensión del biotejido de la invención que sea compatible para su uso, tal como lo determina un experto en la materia. En algunas realizaciones, la invención incluye un biotejido de colágeno que tiene 1x2 cm; 2x3 cm; 4x4 cm, 5 x 5 o 6 x 8. El biotejido de la invención se puede cortar en cualquier tamaño necesario que esté dentro de la limitación del tamaño de la membrana amniótica.

La orientación de la superficie del biotejido de colágeno de la invención se puede identificar de forma visual. El biotejido de colágeno de la invención tiene un diseño "reticular", que permite la identificación visual de las superficies materna y fetal por un experto en la materia. En una realización específica, la orientación de la superficie del biotejido de colágeno se identifica con aumento. El experto en la materia observará que la cara fetal del biotejido de colágeno se puede identificar por su diseño reticular cóncavo, es decir, hundido. A la inversa, la cara materna se puede identificar

por su patrón reticular convexo, es decir, elevado.

El biotejido de colágeno de la invención requiere un tiempo de preparación mínimo antes de su uso. En un ejemplo, el biotejido de colágeno de la invención está listo para usar en 5 minutos o menos, en 10 minutos o menos, en 15 minutos o menos. El tiempo de preparación del biotejido de colágeno de la invención antes de su uso, por ejemplo, como un injerto quirúrgico, comprende la activación mediante rehidratación del biotejido de colágeno deshidratado. En algunos ejemplos, el biotejido de colágeno de la invención está hidratado mientras se encuentre en el sitio quirúrgico. En otros ejemplos, el biotejido de colágeno de la invención se hidrata baja condiciones estériles en una placa. La preparación comprende la hidratación del biotejido de colágeno de la invención utilizando un tampón fisiológico estéril. Además, la preparación comprende hidratar el biotejido de colágeno de la invención con una solución salina estéril, p.ej., solución de NaCl estéril al 0,9%. En algunos ejemplos, la solución salina estéril está tamponada. La hidratación del biotejido de colágeno de la invención requiere al menos 2 minutos, al menos 5 minutos, al menos 10 minutos, al menos 15 minutos, o al menos 20 minutos. La hidratación del biotejido de colágeno de la invención se completa en 5 minutos. En todavía otro ejemplo, la hidratación del biotejido de colágeno de la invención se completa en 10 minutos. En todavía otro ejemplo, la hidratación del biotejido de colágeno de la invención no requiere más de 10 minutos.

El biotejido de colágeno de la invención, una vez hidratado para su uso, por ejemplo como un injerto quirúrgico, presenta una capacidad de sutura incrementada con respecto a las membranas amnióticas de la técnica, tal como lo determina el experto en la materia. El biotejido de colágeno de la invención no se rompe tan fácilmente ni es tan friable como las membranas amnióticas de la técnica. La invención comprende biotejidos de colágeno que se pueden suturar de forma eficaz.

Esterilización

La esterilización del biotejido de la invención se realiza preferentemente por radiación con haz de electrones usando métodos conocidos por un experto en la técnica, por ejemplo, Gorham, D. Byrom (ed.), 1991, Biomaterials, Stockton Press, New York, 55-122. Cualquier dosis de radiación suficiente para matar por lo menos 99,9% de las bacterias u otros organismos potencialmente contaminantes se encuentra comprendida dentro del alcance de la invención. Puede utilizarse una dosis de al menos 18-25 kGy para conseguir la esterilización final del biotejido de la invención. La esterilización del biotejido de la invención no incluye, sin embargo, el almacenamiento en antibióticos o glicerol.

Métodos de uso del biotejido de colágeno de la invención

El biotejido de colágeno de la invención presenta numerosos usos en el campo médico y quirúrgico debido, en parte, a sus propiedades físicas, tales como resistencia biomecánica, flexibilidad, capacidad de sutura, inmunogenicidad baja en comparación con las membranas tradicionales usadas en la técnica. Por ejemplo, se espera que el biotejido de colágeno de la invención tenga una mayor utilidad terapéutica para regeneración guiada de tejidos con respecto a las membranas de la técnica anterior, por ejemplo, membranas sintéticas de PTFE que no se reabsorben tales como Goretex™; membranas sintéticas resorbibles formadas a partir de copolímeros de glicólido y láctido; membranas descritas en el documento nº WO-88/08305; patente nº DE-2631909 y patente US nº 5.837.278.

El método para preparar el biotejido de colágeno de la invención garantiza la conservación de la estructura terciaria y cuaternaria del biotejido, haciendo de este modo que el biotejido resulte ideal para su uso pretendido en el campo médico y quirúrgico. Tal como se describe con detalle a continuación, la invención comprende biotejidos de colágeno cuyas propiedades físicas permiten que resulte adecuado para usos en una diversidad de aplicaciones médicas y dentales que incluyen la reparación de vasos sanguíneos, la reparación del útero, sustituciones de tendones, sustituciones de córnea, piel artificial, tratamiento de la enfermedad periodontal, y cicatrización de heridas. Dependiendo de su uso pretendido, la invención comprende el uso del biotejido de colágeno como una membrana bidimensional, por ejemplo, membranas que se pueden modelar para que formen vasos tubulares; como un andamiaje tridimensional, por ejemplo, un implante, o como una fibra unidimensional.

Métodos de tratamiento usando el biotejido de colágeno de la invención

Los métodos de tratamiento deben entenderse como biotejidos de colágeno para uso en tales métodos.

Métodos para el tratamiento de afecciones cutáneas

La piel humana es un material compuesto de la epidermis y la dermis. La parte superior de la epidermis es el estrato córneo; que es la capa más dura de la piel, así como la más afectada por el entorno que la rodea. Por debajo del estrato córneo se encuentra la parte interna de la epidermis. Por debajo de la epidermis está la dermis papilar, que está formada por tejidos conjuntivos relativamente flexibles que definen el microrrelieve de la piel. La dermis reticular, colocada por debajo de la dermis papilar, es un tejido apretado, conjuntivo que se organiza en el espacio. La dermis reticular también está asociada con arrugas gruesas. Por debajo de la dermis se encuentra la capa subcutánea.

Entre las principales funciones de la piel se incluyen protección, excreción, secreción, absorción, termorregulación, pigmentogénesis, acumulación, percepción sensorial, y regulación de procesos inmunológicos. Estas funciones se ven afectadas de forma perjudicial por los cambios en la estructura de la piel debido al envejecimiento y a una exposición excesiva al sol. Los cambios fisiológicos asociados con el envejecimiento cutáneo incluyen la alteración de

la función de barrera y disminución de la renovación de células epidérmicas, por ejemplo, véase, Cerimele, D. et al., 1990, Br.J. Dermatol., 122, supl. 35, páginas 13 a 20. Sin embargo, los métodos y composiciones en la técnica anterior, presentan un éxito limitado en la mejora de las condiciones de la piel, p.ej. De mejora de la elasticidad y suavidad de la piel, o en la eliminación de arrugas.

El biotejido de colágeno. De la invención presenta aplicaciones médicas, así como cosméticas. El biotejido de colágeno de la invención presenta una utilidad clínica y terapéutica en el tratamiento de condiciones de la piel, incluyendo lesiones cutáneas, envejecimiento de la piel, arrugas, líneas finas, adelgazamiento, reducción de la elasticidad de la piel, piel áspera, afecciones cutáneas congénitas y degenerativas, deficiencia de colágeno VII, y piel dañada por el sol. En determinadas realizaciones, el biotejido de colágeno de la invención se puede usar en forma de un implante subcutáneo para afecciones cutáneas tales como cicatrices por acné, surcos glabelares, cicatrices por extirpación, o cualquier otro defecto del tejido blando conocido de la técnica. El biotejido de colágeno de la invención presenta utilidad clínica y terapéutica en el tratamiento de cambios asociados con el envejecimiento cutáneo. En determinadas realizaciones, el biotejido de colágeno de la invención presenta utilidad en la mejora de las arrugas de la piel, y/u otras condiciones tales como la elasticidad y suavidad de la piel. El biotejido de colágeno de la invención se puede usar como un implante, como un laminado, o como una forma enrollada tridimensional para el tratamiento de afecciones cutáneas. El biotejido de colágeno se espera que presenta una utilidad clínica incrementada respecto a métodos conocidos de la técnica para el tratamiento de tales afecciones cutáneas, p.ej., las patentes US nº 5.972.999, nº 5.418.875, nº 5.332.579 y nº 5.198.465, en parte debido a su estabilidad puede proporcionar un efecto duradero más prolongado.

En una realización preferente, el biotejido de colágeno de la invención está complementado adicionalmente con uno o más agentes conocidos de la técnica para el tratamiento de una afección cutánea. Entre los ejemplos de tales agentes se incluyen vitaminas, minerales, preparaciones basadas en catequina, N-acetilglucosamina y glucosamina (ver, p.ej., Neldner, 1993, Amer. Acad. Derm. Annl. Mtg. Wash. DC.; Lubell 1996, Cosmetic Dermatol, 9(7): 58-60; Swaine et al., 1995, J. Am. Board of Family Practice, 8(3): 206-16; Shan et al., 1994, Kidney International, 46(2): 388-95).

El biotejido de colágeno de la invención se puede impregnar con cualquier biomolécula con utilidad en el tratamiento de una afección cutánea, incluyendo antibióticos (tales como clindamicina, minociclina, doxiciclina y gentamicina), hormonas, factores de crecimiento, agentes antitumorales, agentes antifúngicos, agentes antivíricos, medicamentos para el dolor, antihistamínicos, agentes antiinflamatorios, agentes antiinfecciosos que incluyen, pero no se limitan a plata (tal como sales de plata, que incluyen, pero no se limitan a nitrato de plata y sulfadiazina de plata), plata elemental, antibióticos, enzimas bactericidas (tales como lisozoma), agentes para curación de heridas (tales como citoquinas, incluyendo PDGF, TGF y timosina), ácido hialurónico como un agente para la cicatrización de heridas, selladores de heridas (tales como fibrina con o sin trombina), atrayentes celulares y reactivos de andamiaje (tales como fibronectina). En un ejemplo específico, el biotejido de colágeno se puede impregnar con al menos un factor de crecimiento, por ejemplo, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento epitelial, etc. El biotejido también se puede impregnar con moléculas pequeñas, tales como moléculas orgánicas pequeñas, tales como inhibidores específicos de procesos bioquímicos particulares, por ejemplo, inhibidores de receptores de membrana, inhibidores de quinasas, inhibidores del crecimiento, fármacos anticáncer, antibióticos, etc.

Heridas y quemaduras

El biotejido de colágeno de la invención se espera que presente una utilidad clínica incrementada como apósito para heridas, para potenciar la reparación de tejidos duros y/o blandos, en comparación con otros biomateriales conocidos en la técnica, p.ej. los descritos en las patentes US nº 3.157.524, nº 4.320.201, nº 3.800.792, nº 4.837.285 y nº 5.116.620, debido en parte a sus propiedades físicas. Dado que el biotejido de colágeno de la invención mantiene la estructura cuaternaria nativa del colágeno, proporciona un aumento del crecimiento interior del tejido a través de la migración celular a los intersticios de la matriz de colágeno. El biotejido de la invención permite que las células se adhieran y crezcan en la matriz de colágeno, y que sinteticen sus propias macromoléculas. De esta manera, las células producen una nueva matriz que permite el crecimiento del nuevo tejido. Tal desarrollo celular no se observa en otras formas conocidas de colágeno tales como fibras, lanas y colágeno soluble.

En algunas realizaciones, se proporciona un biotejido de colágeno de la invención para el tratamiento de heridas mediante la aplicación del biotejido de colágeno directamente sobre la piel del sujeto, es decir, sobre el estrato córneo, en el sitio de la herida, de manera que se cubre la herida, por ejemplo utilizando una cinta adhesiva. En otras realizaciones, se proporciona un biotejido de colágeno de la invención para tratar una herida utilizando el biotejido de colágeno de la invención como implante, p.ej. como implante subcutáneo.

La invención comprende potenciar la tasa de cicatrización de heridas mediante la adición de una macromolécula capaz de estimular el crecimiento hacia el interior del tejido en el biotejido de colágeno de la invención. Entre tales macromoléculas se incluyen ácido hialurónico, fibronectina, laminina y proteoglicanos (ver, p.ej., Doillon et al., (1987) Biomaterials 8:195-200; y Doillon y Silver (1986) Biomaterials 7:3-8).

La invención comprende además la incorporación de agentes farmacológicamente activos que incluyen un factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento de tipo insulínico, factor de crecimiento epidérmico, factor beta de crecimiento de transformación, factor de angiogénesis, antibióticos, agentes antifúngicos, agentes

espermicidas, hormonas, enzimas, inhibidores enzimáticos en el biotejido de colágeno de la invención tal como se describe en la presente memoria en la sección 5.4.2.7 para su administración en la piel, y cualquier biomolécula descrita anteriormente. Preferentemente, los agentes farmacológicamente activos se proporcionan en una cantidad fisiológicamente eficaz.

En algunas realizaciones, el biotejido de colágeno se llena adicionalmente con células vivas, incluyendo células madre alogénicas, células madre y células adultas autólogas, antes de su aplicación en el sitio de la herida.

El biotejido de colágeno de la invención resulta particularmente útil para el tratamiento de infecciones de heridas, por ejemplo, infecciones de heridas después de una degradación de heridas quirúrgicas o traumáticas. En una realización particular, el biotejido de colágeno se impregna con una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente útil en el tratamiento de una infección de heridas, que incluye un antibiótico, un agente antimicrobiano, y un agente antibacteriano. El biotejido de colágeno, la invención presenta utilidad clínica y terapéutica en el tratamiento de infecciones de heridas por cualquier microorganismo conocido en la técnica, por ejemplo, microorganismos que infectan heridas que se originan dentro del cuerpo humano, que es un depósito conocido para los organismos patógenos, o de origen ambiental. Un ejemplo no limitativo de los microorganismos, cuyo crecimiento en heridas se puede reducir o evitar con los métodos y composiciones de la invención, son especies de *S. aureus, St. epidermis*, *E. coli, Klebsiella* y *Pseudomonas*, y entre las bacterias anaerobias, *Clostridium welchii* o *tartium*, que son la causa de gangrena gaseosa, principalmente en heridas traumáticas profundas.

En otras realizaciones, el biotejido de colágeno de la invención se usa para el tratamiento de heridas, incluyendo heridas epidérmicas, heridas cutáneas, heridas crónicas, heridas agudas, heridas externas, heridas internas (por ejemplo, el biotejido de colágeno se pueden volver alrededor de un sitio de anastosmosis durante la cirugía para evitar la fuga de sangre por las líneas de sutura, y para evitar que el organismo forme adherencias en el material de sutura), heridas congénitas (por ejemplo, epidermólisis bullosa distrófica). En particular, el biotejido de colágeno presenta una utilidad incrementada en el tratamiento de úlceras de presión (por ejemplo, úlceras de decúbito). Las úlceras de presión se producen frecuentemente en pacientes sujetos a un periodo prolongado de postración, por ejemplo, tetrapléjicos y parapléjicos que padecen pérdida de la piel debido a los efectos de la presión localizada. Las úlceras de presión resultantes presentan erosión dérmica y pérdida de la epidermis y apéndices cutáneos.

El biotejido de colágeno de la invención se puede usar además en el tratamiento de quemaduras, incluyendo quemaduras de primer grado, quemaduras de segundo grado (quemaduras de grosor parcial), quemaduras de tercer grado (quemaduras de grosor total), infección de heridas por quemaduras, infección de heridas por quemaduras extirpadas y sin extirpar, infección de heridas de injertos, infección del sitio donante, pérdida del epitelio de una herida por quemadura previamente injertada o curada o sitio donante de injerto de piel, e impétigo por herida de quemadura.

Ingeniería de tejidos

La invención comprende el uso del biotejido de colágeno de la invención como vehículo para el transporte de células de piel en cultivo, p.ej. como soporte para el crecimiento y diferenciación epitelial. En determinadas realizaciones, para llenar el biotejido con células para formar tejidos y/o organoides (es decir, que se asemejan en la apariencia superficial o en la estructura a cualquiera de los órganos o glándulas del cuerpo), el biotejido se puede tratar con factores de adhesión celular para aumentar la unión de células al biotejido durante el proceso de repoblación del biotejido con tales nuevas células. En determinadas realizaciones, el grado de unión de las células aumenta mediante el tratamiento de la membrana amniótica con suero, por ejemplo, suero humano o bovino fetal. En otras realizaciones, el alcance de la unión de las células aumenta mediante el tratamiento de la membrana amniótica con fibronectina.

El biotejido de colágeno de la invención se puede usar en técnicas de regeneración guiada de tejidos, por ejemplo, para regenerar o sustituir tejido enfermo o dañado. La invención comprende el uso del biotejido de la invención mediante el implante de forma directa del biotejido en el sitio del tratamiento o mediante la formación de un dispositivo protésico. El biotejido de colágeno de la invención es particularmente útil en cualquier situación, tal como después de cirugía especialmente cirugía oral o dental (tal como se describe con más detalle en la Sección 5.4.2.2), en la que se desea el aumento de la curación de heridas y/o sustitución de la dermis. La utilidad del biotejido de colágeno de la invención en la regeneración guiada de tejidos se debe en parte a su capacidad de proporcionar condiciones que evitan el crecimiento hacia adentro de otros tejidos en la zona en la que se necesita la regeneración.

Por ejemplo, cuando se retira una parte sustancial de una raíz dental debido a caries o enfermedad, resulta deseable que se produzca regeneración de hueso sano para sustituir el tejido de hueso eliminado. Sin embargo, se ha encontrado que el hueco que deja la retirada de hueso se rellena rápidamente con tejido conjuntivo y que este crecimiento hacia el interior del tejido conjuntivo evita de forma eficaz la regeneración ósea. Para evitar dicho crecimiento hacia el interior, el biotejido de colágeno de la invención se puede insertar quirúrgicamente alrededor de la periferia del hueco de la herida. El biotejido impide o dificulta la invasión de hueco de la herida por tipos de células no deseadas y de este modo permite que las células preferentes crezcan en el cuerpo, curando de ese modo de la herida.

En algunas realizaciones, el biotejido de colágeno tiene utilidad como un trasplante para la reconstrucción de la superficie ocular por ejemplo en un sujeto con síndrome de Stevens Johnson, deficiencia de células madre límbicas

secundaria a una quemadura química límbica, o con quemaduras químicas y/o térmicas. Se espera que el biotejido de la invención presente una utilidad clínica incrementada, por ejemplo en la estimulación de la epitelización. Se espera que el biotejido de la invención presente una utilidad clínica incrementada con respecto a las membranas amnióticas usadas en la técnica con fines de ingeniería de tejidos; véase, por ejemplo, Gomes et al., 2003, Opthalmology, 119: 166-73; Ti et al., 2001, Opthalmology, 108: 1209-1217; Meller et al., 2000, Opthalmology, 107: 980-9; Gris et al., 2002 Opthalmology, 109: 508-12; Koizumi et al., 2000, Invest. Opthal. and Visual Science, 41: 2506-13; Pires et al., 1999, Arch. Opthalmol. 117: 1291-7; Tseng et al., 1998, Arch. Opthalmol. 116:431:441; Heiligenhaus et al., 2001 Invest. Opthal. and Visual Science 42: 1969-74; Anderson et al., 2001, Br. J. Opthalmol. 85: 567-75.

La invención comprende llenar el biotejido de colágeno con células vivas, incluyendo células de tejido adulto, células autólogas y células madre. Las células madre para uso en los métodos de la invención pueden ser células pluripotentes, o células diferenciadas específicas de tejido. Las células madre para uso en los métodos de la invención pueden obtenerse mediante métodos estándares conocidos por el experto en la materia, aunque no se proporcionan a partir de embriones humanos. Preferiblemente, las células madre se recogen de acuerdo con el método descrito en la solicitud de patente US nº 10/74.976, presentada el 13 de febrero de 2002.

La invención comprende el uso del biotejido de colágeno de la invención (p.ej., en forma de andamiajes tridimensionales) para el desarrollo de tejido y organoides bioingenieriles, incluyendo vasos sanguíneos, válvulas cardiacas, hígado, páncreas y ligamentos. Aunque sin pretender limitarse a ningún mecanismo de acción particular, la utilidad del biotejido de la invención como tejido de bioingeniería se debe en parte a su propiedad hemostática de estimulación de la coagulación sanguínea. El biotejido de la invención resulta particularmente útil para prótesis vasculares y como un trasplante en cirugía vascular. El biotejido de la invención se puede usar, por ejemplo, como una circunferencia que cubre los sitios de anastomosis de los vasos sanguíneos (o vasos que se dirigen a injertos) durante los procedimientos de cirugía vascular para evitar fugas de sangre de las líneas de sutura y evitar que el cuerpo forme adherencias en el material de sutura.

Métodos de uso de los biotejidos de colágeno en procedimientos quirúrgicos

La invención comprende el uso del biotejido de colágeno de la invención como injerto quirúrgico. La invención comprende un injerto quirúrgico que comprende un biotejido de colágeno de la invención o un laminado del mismo. En la presente memoria se describen además métodos para preparar el injerto quirúrgico.

En algunas realizaciones, se proporciona un injerto quirúrgico que comprende el biotejido de colágeno de la invención en un procedimiento quirúrgico, de manera que se aplica directamente el injerto quirúrgico en el sitio quirúrgico del sujeto, p.ej. un sitio interno o un sitio externo. En algunas realizaciones, el biotejido de colágeno se usa como injerto quirúrgico durante un procedimiento quirúrgico tal como se describe en mayor detalle posteriormente, por ejemplo para prevenir fugas de sangre de las líneas de sutura y para evitar que el cuerpo forme adherencias a los materiales de sutura. En otras realizaciones, el injerto quirúrgico se usa como una cubierta de los sitios de anastomosis, por ejemplo, del tracto GI durante la cirugía GI para evitar fugas de líquidos intestinales y biliares por las líneas de sutura y para evitar que el cuerpo forme adherencias a los materiales de sutura.

La invención comprende el uso del biotejido como un injerto o apósito para cubrir heridas cutáneas de quemadura o quirúrgicas; para evitar la adherencia en todas las cirugías intraperitoneales u otra reconstrucción de las superficies serosas que cubren el abdomen, la cavidad torácica y el pericardio; para reconstruir todas las superficies de mucosa que revisten las cavidades oral y nasal, los tractos respiratorios, los tractos gastrointestinales y los tractos urogenitales; como un sustrato para apoyar la reparación dural en cirugías cerebrales; como un sustrato para estimular la regeneración de los nervios en los sistemas nerviosos central y periférico; y para reconstruir los tejidos blandos para evitar la adherencia en reparaciones de articulaciones o tendones.

La invención comprende impregnar el injerto quirúrgico de la invención con una o más biomoléculas, preferiblemente un agente terapéutico, dependiendo del uso quirúrgico particular pretendido. Tales biomoléculas incluyen pero no se limitan a, antibióticos (tales como clindamicina, minociclina, doxiciclina, gentamicina), hormonas, factores de crecimiento, agentes antitumorales, agentes antifúngicos, agentes antivirales, medicamentos para el dolor, antihistamínicos, agentes antiinflamatorios, agentes antiinfecciosos que incluyen, pero no se limitan a plata (tales como sales de plata, que incluyen, pero no se limitan a nitrato de plata y sulfadiazina de plata), plata elemental, antibióticos, enzimas bactericidas (tal como lisozima), agentes de cicatrización de heridas (tales como citoquinas que incluyen, pero no se limitan a PDGF, TGF y timosina), ácido hialurónico como agente de cicatrización de heridas, selladores de heridas (tales como fibrina con o sin trombina), atrayentes celulares y reactivos de andamiajes (tales como fibronectina). En un ejemplo específico, el biotejido de colágeno se puede impregnar con al menos un factor de crecimiento, por ejemplo, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento epitelial, etc. El biotejido también se puede impregnar con moléculas orgánicas pequeñas tales como inhibidores específicos de procesos bioquímicos particulares, por ejemplo, inhibidores de receptores de membrana, inhibidores de quinasas, inhibidores del crecimiento, fármacos anticáncer, antibióticos, etc.

La invención comprende además llenar el injerto quirúrgico de la invención con células vivas, incluyendo células madre, células madre pluripotentes, células madre multipotentes, células madre específicas de tejido, células madre de tipo embrionario, células progenitoras comprometidas y células fibroblastoides. En otras realizaciones, la invención

comprende llenar el injerto quirúrgico de la invención con clases específicas de células precursoras, incluyendo condrocitos, hepatocitos, células hematopoyéticas, células parenquimatosas pancreáticas, neuroblastos y células progenitoras musculares.

Oftalmología

El biotejido de colágeno de la invención tiene utilidad clínica y terapéutica en el tratamiento de una enfermedad o trastorno ocular. El biotejido de colágeno de la invención resulta particularmente útil para el tratamiento y/o prevención de enfermedades de la superficie ocular, incluyendo úlceras/perforaciones de córnea, queratopatía bullosa, dermoides/tumores oculares, pterigión primario, defecto epitelial de la córnea persistente, quemaduras alcalinas agudas y crónicas, quemaduras térmicas, aniridia, queratitis atópica, deficiencia de células madre límbicas idiopáticas, pannus corneal, neovascularización, fusión corneal reumatoide, penfigoide cicatricial ocular, ampolla de filtración con fugas, tubo de la válvula de Ahmed expuesto, celulitis por *Serratia* en el simbléfaron posterior y síndrome de Stevenson Johnson agudo y crónico. El biotejido de colágeno de la invención resulta particularmente eficaz en la estimulación de la cicatrización de defectos persistentes del epitelio corneal con ulceración; en la estimulación de la epitelización; en la facilitación del crecimiento de células epiteliales y células madre; en la reducción de la inflamación y el dolor, en la inhibición de la angiogénesis y la formación de cicatrices; en la restauración del fenotipo epitelial; y como un sustrato alternativo al autoinjerto de conjuntiva durante la retirada de la "esclerótica desnuda" del pterigión.

La composición y el injerto quirúrgico de la invención pueden utilizarse en el trasplante utilizando el biotejido de colágeno de la invención para el tratamiento de la queratopatía bullosa sintomática, preferiblemente en seres humanos, lo más preferiblemente en seres humanos con un potencial visual reducido. El biotejido de la invención se espera que presente una utilidad terapéutica y clínica incrementada con respecto a otros tratamientos convencionales usados en la técnica para el tratamiento de la queratopatía bullosa sintomática, específicamente, la construcción de colgajo conjuntival. La ventaja del trasplante usando el biotejido de la invención con respecto a procedimientos convencionales usados en la técnica para el tratamiento de la queratopatía bullosa sintomática, específicamente, en la construcción de colgajo conjuntival, incluyen, por ejemplo, la reducción del dolor, la facilidad de uso, un aspecto cosméticamente más aceptable, y una reducción de las complicaciones tales como la ptosis y la deficiencia de células madre límbicas. El biotejido de colágeno de la invención proporciona una alternativa mejor a los colgajos conjuntivales para la estimulación de la cicatrización de defectos del epitelio corneal con ulceración; un método mejorado para la reconstrucción de la superficie conjuntival para lisis del simbléfaron; un método mejorado para la extirpación quirúrgica de tumores, lesiones, o tejido cicatricial de la superficie conjuntival o corneal; un método mejorado para cirugías de glaucoma mediante la corrección de fugas de ampolla; un sustrato alternativo mejorado para el autoinjerto conjuntival durante la retirada de la "esclerótica desnuda" del pterigión; y un método mejorado para prevenir la reaparición de la queratopatía de banda.

La invención proporciona además el uso del biotejido como injerto quirúrgico oftalmológico. En la presente memoria se describe la preparación de injertos que comprenden el biotejido de la invención, que comprende además uno o más agentes terapéuticos que se pueden administrar en el receptor cuando se encuentran unidos al receptor. Entre los ejemplos de agentes terapéuticos que se pueden administrar usando el biotejido de la invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, pilocarpina, eritromicina, gentamicina, vancomicina, tobramicina, netilmicina, sulfato de polimixina B, trimetoprim, amfotericina B, agentes anticáncer, antibióticos, ciclosporina, etc.

El biotejido de colágeno de la invención también resulta de utilidad para reducir la turbidez corneal inducida por queratectomía fotorrefractiva/terapéutica con láser excimer.

El biotejido de colágeno de la invención para uso en procedimientos oftálmicos se puede proporcionar en diversas configuraciones, incluyendo insertos, placas, partículas, geles, inyecciones acuosas, esponjas y películas.

Las técnicas de cirugía convencionales para injertos oftálmicos son conocidas por el experto en la materia.

Un protocolo a modo de ejemplo para uso de un biotejido de colágeno de la invención en forma de un injerto quirúrgico oftálmico puede comprender las siguientes etapas: se extirpan los tejidos de córnea y/o conjuntiva dañados; se proporciona el injerto quirúrgico, preparado de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria, bajo condiciones estériles, y se recorta con una técnica a mano alzada para cubrir el epitelio de la córnea o la esclerótica desnuda. Usando una sutura, el Injerto se ancla a la unión de la esclerótica desnuda y la conjuntiva; se colocan suturas cardinales; y las suturas interrumpidas se usan para crear una distribución uniforme de la tensión en la superficie del injerto; de manera que se evita cualquier espacio entre el Injerto y la esclerótica o córnea del receptor. En la unión del injerto y el huésped, el borde libre del injerto debe permanecer bajo la membrana conjuntival del receptor para permitir el deslizamiento del epitelio del huésped a través de la lámina basal en el punto de unión con el tejido de un donante, de lo contrario el destinatario extruirá el injerto.

Odontología

El biotejido de colágeno de la invención tiene utilidad particular en odontología, por ejemplo, cirugía periodontal, regeneración guiada de tejidos para regeneración del tejido periodontal, regeneración guiada ósea, y cubrimiento de la raíz. La invención comprende el uso del biotejido de colágeno de la invención para estimular la regeneración de defectos intraóseos periodontales, incluyendo defectos periodontales bilaterales emparejados, defectos intraóseos

interdentales, defectos intraóseos de 3 paredes profundos, defectos intraóseos de 2 paredes, y defectos intraóseos 2 y 3. Se espera que el biotejido de colágeno de la invención presente una utilidad terapéutica incrementada y parámetros clínicos mejorados en el tratamiento de defectos intraóseos periodontales con respecto a otras técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, uso de membranas de colágeno entrecruzadas, tales como las descritas en Quteish et al., 1992, J. Clin. Periodontol. 19(7): 476-84; Chung et al., 1990, J. Periodontol. 61(12): 732-6; Mattson et al., 1995, J. Periodontol. 66(7): 635-45; Benque et al., 1997, J. Clin. Periodontol. 24(8): 544-9; Mattson et al., 1999, J. Periodontol. 70(5): 510-7). Entre los ejemplos de parámetros clínicos que mejoran usando el biotejido de colágeno de la invención se incluyen índices de placa y gingival, sondaje de la profundidad de la bolsa, sondaje del nivel de unión, y clasificación de la afectación furcal y defecto óseo, que son conocidos por el experto en la materia.

La invención comprende además el uso del biotejido de la invención en el tratamiento de defectos de furcación de clase II, incluyendo defectos bilaterales, defectos de furcación en molares mandibulares de clase II bucales emparejados y defectos de furcación mandibulares bilaterales. La utilidad del biotejido de colágeno de la invención para tratar defectos de furcación de clase II se pueden explicar en parte por su capacidad para regenerar el periodontio perdido en defectos de furcación. Se espera que el biotejido de la invención presente una utilidad terapéutica y clínica incrementada con respecto a las membranas de colágeno usadas en la técnica para el tratamiento de defectos de furcación de clase II, tales como los descritos en Paul et al., 1992, Int. J. Periodontics Restorative Dent. 12: 123-31; Wang et al., 1994, J. Periodontol. 65: 1029-36; Blumenthal, 1993, J. Periodontol. 64: 925-33; Black et al., 1994, J. Periodontol. 54: 598-604; Yukna et al., 1995, J. Periodontol. 67: 650-7).

La invención comprende además el uso del biotejido de la invención en procedimientos de cubrimiento radicular. La utilidad del biotejido de la invención en el cubrimiento radicular se puede explicar en parte debido a su capacidad para sustituir tejido gingival perdido, dañado o enfermo basándose en principios de regeneración tisular guiada. Se espera que el biotejido de la invención presente una utilidad clínica incrementada en el cubrimiento radicular en comparación con las membranas de colágeno usadas en la técnica tradicionalmente para el cubrimiento radicular tales como las que se describen en Shieh et al., 1997 J. Periodontol., 68: 770-8; Zahedi et al., 1998 J. Periodontol. 69: 975-81; Ozcan et al., 1997 J. Marmara Univ. Dent. Fa. 2: 588-98; Wang et al., 1997 J. Dent. Res. 78 (Edición Especial): 119 (Res. 106), por razones que se han mencionado anteriormente.

La invención comprende además el uso del biotejido de colágeno en un sujeto con una enfermedad periodontal, incluyendo periodontitis y gingivitis. El biotejido de la invención también presenta utilidad clínica como un adyuvante a procedimientos de raspado y alisado radicular. La invención comprende tratar un sujeto con una enfermedad periodontal utilizando un biotejido de colágeno de la invención. Un método ejemplar para el tratamiento de una enfermedad periodontal en un sujeto utilizando un biotejido de colágeno de la invención comprende insertar un biotejido de colágeno, que se impregna preferiblemente con un antibiótico, tal como gluconato de clorhexidina, en uno o más bolsillos periodontales en el sujeto, por ejemplo, mayores o iguales a 5 mm. Preferentemente, el biotejido de colágeno es biodegradable.

El biotejido de colágeno de la invención para uso en odontología se puede impregnar con una o más biomoléculas dependiendo del tipo de trastorno dental que se está tratando. Cualquier biomolécula conocida en la técnica para el tratamiento de trastornos dentales está incluida en los métodos descritos en la presente memoria y composiciones de la invención. En una realización específica, el biotejido de colágeno usado en el tratamiento de un trastorno dental asociado a una infección se puede impregnar con uno o más antibióticos, incluyendo doxociclina, tetraciclina, gluconato de clorhexidina, y minociclina.

Neurología

El biotejido de colágeno de la invención también resulta útil para la reparación de nervios lesionados, particularmente en la reparación de nervios periféricos seccionados, y procedimientos neuroquirúrgicos. La invención comprende el uso del biotejido de colágeno, por ejemplo, en sustituciones durales y en la reparación de nervios periféricos. El biotejido de colágeno de la invención presenta una utilidad clínica incrementada como sustituto dural o en la reparación de nervios al contrario que los otros métodos usados en la técnica, por ejemplo, Berger et al., 1970, Acta. Neurochir. 23: 141; Ducker et al., 1968, Mil. Med. 133: 298; patentes US nº 4.778.467; nº 4.883.618, nº 3.961.805 y nº 5.354.305, por los motivos señalados anteriormente.

En algunas realizaciones, el biotejido de colágeno de la invención puede utilizarse como prótesis en torno a anastomosis nerviosas, por ejemplo puede utilizarse para envolver anastomosis de nervios periféricos. El biotejido de colágeno de la invención presenta una utilidad particular en la reparación nerviosa, por ejemplo, mediante la estimulación de la formación de un andamiaje de tejido conjuntivo longitudinal a través de la zona de reparación y de este modo da lugar a un patrón longitudinal de regeneración de células de la vaina y axonales.

La reparación de los nervios periféricos se realiza habitualmente usando suturas en un procedimiento conocido como neurorrafia (Jennings et al., 1955, Surgery: 206). Sin embargo, este enfoque ha tenido un éxito limitado dado que los métodos de sutura de nervios lesionados resultan difíciles. De esta manera, el biotejido de colágeno de la invención puede proporcionar una alternativa a un método sin suturas para la reparación nerviosa, a través del cual, por ejemplo, los extremos del nervio se incluyen en un dispositivo protésico tubular que comprende el biotejido de la invención, y de esta manera aproxima los extremos seccionados hasta que se encuentran muy próximos para la regeneración.

Urología

El biotejido de colágeno de la invención presenta una utilidad en particular en la corrección de la incontinencia urinaria. La incontinencia urinaria resulta de la insuficiencia de la uretra para permanecer cerrada durante el almacenamiento. La causa puede ser extrínseca, por ejemplo, escaso apoyo anatómico de la uretra y cuello de la vejiga dando como resultado incontinencia y responde a la resuspensión del suelo pélvico. La insuficiencia de la uretra, alternativamente, puede ser intrínseca, es decir, una mala función uretral. Tradicionalmente, la incontinencia urinaria se corrige usando agentes de carga, tales como colágeno, grasa y silicona (Véase, la revisión de Lightner, 2002, Current Opinión in Urology, 12(4): 333-8). El biotejido de colágeno de la invención presenta una mayor utilidad, es decir, mejora la continencia, con respecto a los agentes de carga que se describen en la técnica. Además, el biotejido de colágeno de la invención presenta una mayor utilidad terapéutica, por ejemplo, reducción de las complicaciones locales, reducción de la infección del tracto urinario, ninguna reacción del huésped, durabilidad fiable, y mayor seguridad.

La utilidad del biotejido de colágeno de la invención para corregir la incontinencia urinaria se debe, en parte, a las características físicas únicas del biotejido de colágeno tal como se describe en la presente memoria, en particular, su no inmunogenicidad. En algunas realizaciones, el biotejido de colágeno se usa como un implante, por ejemplo, como un implante uretral. Aunque no se pretende restringirse a ninguna teoría en particular, el biotejido de colágeno de la invención puede presentar una utilidad terapéutica mejorada al aumentar, por ejemplo, la presión del cierre de la uretra y la resistencia al flujo de salida pasivo de orina.

Ortopedia

El biotejido de colágeno de la invención se puede usar en procedimientos de cirugía ortopédica. En determinadas realizaciones, el biotejido de colágeno se puede usar para defectos ortopédicos, por ejemplo, defectos adquiridos o congénitos. La reconstrucción de los defectos locales que resultan de traumatismos o reanimación quirúrgica de un tumor óseo es un problema principal en la cirugía ortopédica o maxilofacial. Típicamente, se han usado sustitutos de hueso sintético o membranas de colágeno debidas en parte a sus actividades osteoinductoras (Véase, por ejemplo. Rao et al., 1995, J. Biomater. Sci. Polymer Edn. 7(7): 623-45). Sin embargo, un problema común ha sido una infección sistémica como resultado del material implantado. El biotejido de colágeno de la invención, sin embargo, resulta ventajoso con respecto al material usado en la técnica, particularmente debido a su baja inmunogenicidad como un sustituto óseo para uso en defectos ortopédicos. En algunas realizaciones, el biotejido de colágeno se puede usar como prótesis para la reconstrucción de tendones, ligamentos y cartílago. En otras realizaciones, el biotejido de colágeno de la invención puede utilizarse como prótesis en la sustitución ósea.

Cirugía cardiovascular

El biotejido de colágeno de la invención se puede usar en procedimientos de cirugía cardiovascular, por ejemplo, como una prótesis para la construcción de vasos grandes y pequeños; para la reparación de malformaciones congénitas de los pasos y válvulas dañadas.

El biotejido de la invención presenta una utilidad particular como un trasplante en cirugía vascular, por ejemplo, trasplante de venas o arterias. La utilidad del biotejido en cirugía vascular se debe, en parte, a su no toxicidad, no Inmunogenicidad; estabilidad; facilidad de manipulación; característica antitrombogénica; porosidad mínima del implante de la pared celular; disponibilidad en diversos tamaños y reproducibilidad del material. En algunas realizaciones, el biotejido de la invención puede utilizarse como un sustituto de una válvula.

Administración de fármacos

El biotejido de colágeno de la invención se puede usar como un vehículo de administración de fármacos para la administración controlada de un fármaco, por ejemplo, un agente terapéutico. En algunas realizaciones, el biotejido de colágeno administra el uno o más agentes terapéuticos en un sujeto, preferentemente un ser humano. Los agentes terapéuticos incluidos dentro del alcance de la Invención son proteínas, péptidos, polisacáridos, conjugados de polisacáridos, vacunas basadas en la genética, vacunas atenuadas vivas, células completas. Un ejemplo no limitante de fármacos para uso en los métodos de la Invención son antibióticos, agentes anticáncer, agentes antibacterianos, agentes antivíricos; vacunas; anestésicos; analgésicos; agentes antiasmáticos; agentes antiinflamatorios; antidepresivos; agentes antiartríticos; agentes antidiabéticos; antipsicóticos; estimulantes del sistema nervioso central; hormonas; inmunosupresores; relajantes musculares y prostaglandinas.

El biotejido de colágeno se puede usar como un vehículo de administración para la administración controlada de una o más moléculas pequeñas en un sujeto, preferentemente en un ser humano. En algunas realizaciones, el biotejido de colágeno administra una o más moléculas pequeñas en un sujeto, preferentemente un ser humano. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "molécula pequeña", y expresiones análogas, se incluyen, péptidos, peptidomiméticos, aminoácidos, análogos de aminoácidos, polinucleótidos, análogos de polinucleótidos, nucleótidos, análogos de nucleótidos, compuestos orgánicos o inorgánicos (es decir, incluyendo compuestos heteroorgánicos y organometálicos) que presentan un peso molecular inferior a aproximadamente 10.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 5.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular Inferior a aproximadamente 1.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 500 gramos por mol, compuestos

orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular Inferior a aproximadamente 100 gramos por mol, y sales, ésteres, y otras formas farmacéuticamente aceptables de tales compuestos. Además, se incluyen sales, ésteres, y otras formas farmacéuticamente aceptables de tales compuestos.

En determinadas realizaciones, el biotejido de colágeno de la invención como un vehículo para la administración de fármacos da como resultado un aumento de la absorción del fármaco; un perfil farmacocinético mejorado y la distribución sistémica del fármaco con respecto a los demás sistemas de administración de fármaco conocidos en la técnica. Fármacocinética mejorada se refiere a que se consigue una mejora del perfil farmacocinético tal como se mide, por ejemplo, mediante parámetros farmacocinéticos convencionales, tales como tiempo para alcanzar una concentración máxima en plasma ($T_{máx}$); magnitud de la concentración máxima en plasma ($C_{máx}$); tiempo para inducir una concentración en sangre o en plasma detectable (T_{lag}). Por absorción incrementada se hace referencia a que la absorción del fármaco mejora según se mide con tales parámetros. La medida de los parámetros farmacocinéticos se realiza de forma rutinaria en la técnica.

Ejemplos

Método para producir el biotejido de colágeno

MATERIALES

Los siguientes materiales se usaron en la preparación del biotejido de colágeno.

Materiales/Equipo

- Copia del registro de entrega
- Copia de Material/Historia de Salud Familiar/Consentimiento Informado
- Etiqueta de origen con código de barras (número de ID del donante)
- N° de recogida (se asigna un número secuencial al material entrante)
- Registro de procesamiento de tejidos (n° de ID de documento ANT-19F); se mantiene un registro detallado del procesamiento de cada número de lote
- Placenta humana (con menos de 48 al comienzo del procesamiento)
- Pinzas/hemostatos quirúrgicos estériles
- Tijeras estériles
- Bisturís estériles
- Raspador de células estéril (Nalgene NUNC Int. R0896
- Gasa estéril (PSS 4416 no estéril, esterilizada)
- Bandejas de acero inoxidable estériles para aclarado
- Bandejas de acero inoxidable desinfectadas para procesamiento
- Cesta de plástico desinfectada
- Solución de NaCI al 0,9% estéril (Baxter 2F7124)
- Agua Estéril (Milli Q plus 09195 o Baxter 2F7113)
- Envases estériles para muestras (VWR 15704-014)
- Equipo de protección personal (incluyendo guantes estériles y no estériles)
- Sala limpia certificada
- Solución de descelularización preparada previamente (células D); monohidrato del ácido desoxicólico al 0,01-1%
- Recipiente desinfectado
- Plataforma oscilante (modelo 100 de VWR)

- Cronómetro (VWR 21376890)
- Malla para marco de plástico desinfectada
- Film para envolver de PVC
- Bomba de vacío (Schuco-Vac 5711-130)
- Secador de gel (es decir, secador de calor; modelo 583 de BioRad)
- Tabla para cortar de acero inoxidable desinfectada
- Bolsas para envasado
- Regla de acero inoxidable estéril (General Tools MFG. Co 1201)
- Termómetro digital trazable (modelo 61161-364, Control Company)
- Sellador automático Accu-Seal (Accu-Seal, modelo 630-1B6)

La madre gestante fue sometida a cribado en el momento del nacimiento para enfermedades transmisibles, tales como VIH, VHB, VHC, HTLV, sífilis, CMV y otros virus, y otros patógenos que podrían contaminar los tejidos de placenta que se están recogiendo. Solamente se usaron los tejidos tomados de donantes cuyas madres dieron negativo o no reactivo a los patógenos mencionados anteriormente para producir el biotejido de colágeno.

Después de parto normal, la placenta, el cordón umbilical y la sangre del cordón umbilical se expulsaron espontáneamente del útero en contracción. La placenta, el cordón umbilical y la sangre del cordón umbilical se recogieron después del nacimiento. Los materiales se transportaron al laboratorio donde se procesaron en condiciones asépticas en una habitación Limpia con un sistema de filtración HEPA, que se encendió al menos una hora antes del procesamiento. Se usaron guantes (estériles o no estériles, según el caso) en todo momento durante la manipulación del producto. Todos los segmentos (residuos) no usados del amnios/corión y líquidos contaminados, generados durante el procesamiento del tejido, se eliminaron lo antes posible.

ETAPA I.

Se estableció un campo estéril con láminas de Steri-Wrap estéril y se colocaron sobre el mismo los siguientes instrumentos y accesorios para el procesamiento.

- envase de bandeja estéril
- raspador de células estéril
- bisturí estéril
- bandeja de procesamiento desinfectada

El n° de ID del recipiente estéril se registró en el registro de procesamiento.

La placenta se retiró del recipiente de transporte y se colocó en la bandeja de acero inoxidable desinfectada. Usando elementos de sujeción y tijeras quirúrgicos, se cortaron aproximadamente 5 cm (2 pulgadas) del cordón umbilical del disco placentario. El cordón umbilical se colocó en un recipiente estéril separado para su procesamiento adicional. El recipiente se marcó con código de barras con ID del tejido; y se identificaron el material y la solución o soluciones de almacenamiento presentes (por ejemplo, tipo de medios). En algunos casos, se descartaba el cordón umbilical si no era necesario para otros proyectos.

Comenzando desde el borde de la membrana placentaria, el amnios se separó del corión usando disección roma con los dedos. Esto se hizo antes de cortar la membrana.

A continuación, el amnios se separó de toda la superficie del corión y disco placentario, la membrana amniótica se cortó alrededor del tronco del cordón umbilical con tijeras y se separó del disco placentario. En algunos casos, si no era posible la separación de los amnios y el corión sin desgarrar el tejido, el amnios y el corión se cortaron del disco placentario como un solo trozo y luego se desprendieron.

El corión se introdujo en un recipiente para muestras independiente para su uso para otros proyectos. El recipiente se etiquetó con el código de barras de ID de tejido, el material y la solución o soluciones de almacenamiento presentes (por ejemplo, tipo de medios) se identificaron, se marcaron con la identificación y se registró la fecha.

Si cualquier trozo de amnios todavía se encontraba unido al disco placentario, éste se desprendía del disco y se

cortaba alrededor del cordón umbilical con tijeras. La placenta se colocó de nuevo en el recipiente de transporte para su uso en otros proyectos.

Los datos apropiados se registraron en el registro de procesamiento de tejidos.

La membrana amniótica se mantuvo en la bandeja con solución estéril de NaCl al 0,9%. Preferentemente, la membrana amniótica se almacena con refrigeración durante un máximo de 72 horas desde el momento del parto antes de la siguiente etapa en el proceso.

ETAPA II.

La membrana amniótica se sacó del recipiente de muestras, un trozo cada vez, y se colocó en la bandeja de acero inoxidable desinfectada. Se colocaron en una bandeja de acero inoxidable estéril independiente llena de agua estéril otros trozos, hasta que estaban listas para su lavado. Se sacaron trozos adicionales de amnios de la bandeja de procesamiento y se colocaron en una bandeja de acero inoxidable para aclarado independiente llena con agua estéril.

La membrana amniótica se enjuagó con agua estéril si estaba extremadamente contaminada con fluidos/materiales de sangre materna o fetales cambiando el agua estéril cuando era necesario.

La membrana amniótica se colocó en la bandeja de procesamiento con la cara materna hacia arriba. Usando un Raspador de Células estéril, se retiró cuidadosamente, tanto como fue posible, la contaminación visible y el material celular del lado materno del amnios. (Nota: se debería aplicar una presión mínima en esta etapa para evitar que se rompa la membrana). Se usó agua estéril para ayudar en la eliminación de las células y los restos celulares. La membrana amniótica se aclaró adicionalmente con agua estéril en la bandeja de enjuague de acero inoxidable estéril independiente.

Se dio la vuelta a la membrana amniótica de manera que la cara fetal estuviera hacia arriba y se colocó de nuevo en la bandeja de procesamiento y se aclaró con agua estéril. El material celular y los restos visibles se retiraron suavemente usando el Raspador de Células (Nota: Se debería aplicar una presión mínima en esta etapa para evitar que se rompa la membrana). Se usó agua estéril para ayudar en la eliminación de las células y los restos celulares.

La membrana amniótica se enjuagó con agua estéril entre las rondas de lavado en bandejas de enjuague estériles independientes. El tejido se limpió tantas veces (rondas de lavado) como era necesario para retirar la mayoría, si no todo, el material celular y los restos visibles desde ambos lados de la membrana. El agua estéril se cambió de las bandejas de aclarado entre aclarados.

La bandeja de procesamiento se enjuagó con agua estéril después de cada ronda de lavado.

Todos los demás trozos de amnios se procesaron de la misma manera y se colocaron en el mismo recipiente. Se fijó un Código de Barras de Id del Tejido, se identificaron el material y la solución o soluciones de almacenamiento presentes (por ejemplo, tipo de medios), se añadieron las iniciales y la fecha.

La información apropiada y la fecha se registraron en el registro de procesamiento de tejidos.

ETAPA III.

La membrana amniótica se retiró de la bandeja de enjuague (o del recipiente de almacenamiento), el exceso de líquido se apretó suavemente con los dedos y la membrana se colocó en el recipiente para muestras estéril. El recipiente se llenó hasta la marca de 150 ml con solución de células D asegurando que toda la membrana amniótica estaba cubierta y el recipiente se cerró.

El recipiente se colocó en el depósito en la plataforma oscilante. La plataforma oscilante se encendió y la membrana se agitó en solución de células D durante un mínimo de 15 minutos y un máximo de 120 minutos en él Ajuste N° 6.

Se estableció un nuevo campo estéril con nuevos instrumentos y la bandeja se desinfectó de la misma manera que en la etapa I. El n° de ID del envase estéril se registró en el registro de procesamiento.

Después de finalizar la agitación, la plataforma oscilante se apagó y se sacó la membrana del recipiente. La membrana se colocó en una nueva bandeja de procesamiento de acero inoxidable estéril. Se añadió solución estéril de NaCl al 0,9% para cubrir la parte inferior de la bandeja.

Usando un nuevo raspador de células estéril, se retiraron las células D y el material celular residuales (si los hubiera) de ambas caras del tejido. Esta etapa se repitió tantas veces como fue necesario para retirar tanto como fuera posible de material celular residual visible de toda la superficie en ambos lados. La membrana se aclaró con solución estéril de NaCl al 0,9% en una bandeja de enjuague independiente entre las rondas de lavado. La solución estéril de NaCl al 0,9% se cambió en las bandejas de aclarado entre aclarados.

Después de completar la última ronda de lavado, la membrana se enjuagó con solución estéril de NaCl al 0,9% y se introdujo en el nuevo recipiente de muestras estéril lleno de solución estéril de NaCl al 0,9%.

Todos los trozos restantes de membrana amniótica se procesaron exactamente de la misma forma.

Cuando se procesaron todos los trozos de membrana amniótica y en el recipiente con la solución estéril de NaCl al 0,9%, el recipiente se introdujo en el depósito de la plataforma oscilante para su agitación durante un mínimo de 5 minutos en el dial n° 6. Después de finalizar la agitación, la membrana se retiró del recipiente de la muestra, la solución estéril de NaCl al 0,9% se cambió en el recipiente y la membrana se colocó de nuevo en el recipiente de la muestra.

El recipiente para muestras se etiquetó con ID de código de barras para tejidos y etiqueta de cuarentena. Se identificaron el material y la solución o soluciones de almacenamiento presentes (por ejemplo, tipo de medios), y se marcó la identificación y la fecha. El recipiente de la muestra se introdujo en una bolsa limpia con cierre de cremallera y se introdujo en la nevera (a 2-8°C).

Todos los datos apropiados se registraron en el registro de procesamiento de tejidos.

Cuando los resultados serológicos estuvieron disponibles, la etiqueta apropiada (serología negativa o para uso exclusivo en investigación) se aplicó en la parte superior de la etiqueta de cuarentena y los recipientes se separaron de los puestos en cuarentena.

ETAPA IV.

Antes de proceder con la etapa IV, se comprobó la revisión del estado de los tejidos para asegurarse que todos los resultados del ensayo aplicables eran negativos.

Se creó un campo estéril con lámina Steri-Wrap estéril y todos los instrumentos y accesorios estériles y desinfectados se prepararon de la misma forma que en las etapas II y III.

La membrana se sacó de la nevera y se colocó en una nueva bandeja de procesamiento de acero inoxidable estéril. Se añadió solución estéril de NaCl al 0,9% para cubrir la parte inferior de la bandeja.

Todo el material y restos celulares visibles (si los hubiera) se retiraron suavemente usando un nuevo raspador de células estéril (nota: se debería aplicar una presión mínima en esta etapa para evitar el desgarro de la membrana). Se usó solución estéril de NaCl al 0,9 % para ayudar en la eliminación de las células y los desechos.

La membrana se aclaró en la bandeja de enjuague de acero inoxidable estéril independiente llena con solución estéril de NaCl al 0,9%. La Solución de NaCl al 0,9% se cambió entre las rondas de lavado. La membrana se colocó en un nuevo recipiente de muestras estériles, el recipiente se llenó con solución estéril recién preparada de NaCl al 0,9 % y se colocó en la plataforma oscilante para su agitación durante un mínimo de 5 minutos en el Ajuste N° 6.

La etapa anterior se repitió 3 veces y la solución estéril de NaCl al 0,9% se cambió entre cada agitación. Los datos apropiados se registraron en el Registro de Procesamiento de Tejidos.

Se sacó la membrana del recipiente de especímenes, un trozo cada vez, el exceso de fluido se eliminó apretando suavemente con los dedos y la membrana se colocó en una bandeja de procesamiento estéril. La membrana se estiró suavemente hasta aplanarla; asegurándose de que la cara fetal estaba hacia abajo.

Se preparó el marco cortando la lámina de plástico desinfectada con tijeras estériles. El tamaño del marco debería ser aproximadamente 0,5 cm más pequeño en cada dirección que el segmento de la membrana. El marco se aclaró en la bandeja de enjuague rellena con solución estéril de NaCl al 0,9%.

El marco se colocó sobre la superficie de la membrana ligeramente estirada y se presionó sobre ella suavemente. Es fundamental que el lado suave de del marco de plástico se coloque enfrente del tejido.

Usando un bisturí, se cortó la membrana alrededor del marco dejando aproximadamente 0,5 cm de extensión más allá de los bordes del marco. El exceso de membrana se colocó de nuevo en el recipiente de la muestra.

Los bordes de la membrana que se extienden más allá del marco se envolvieron sobre los bordes del marco usando abrazaderas o pinzas y se colocaron al lado en la misma bandeja.

El siguiente trozo de membrana se procesó de la misma manera. Resulta importante que la zona total a secar no supere 300 cm^2 por secador de calor. A la vez que el trozo de membrana se 'desenmarca', los trozos sin enmarcar deberían permanecer en el recipiente en solución estéril de NaCl al 0,9%.

Se ajustaron las temperaturas de secado de los secadores y se verificaron usando un termómetro digital calibrado con sonda extendida. La temperatura de secado se estableció en 50 °C. Los datos se registraron en el Registro de Procesamiento de Tejidos.

Se activó la bomba de vacío.

Se colocó una gasa estéril en la plataforma de secado del secador de calor, cubriendo una superficie ligeramente superior a la superficie de membrana enmarcada. Es importante asegurarse de que el espesor total de la capa de

gasa no supere un espesor de una gasa de 4 x 4 doblada.

Una lámina de malla de marco de plástico se colocó en la parte superior de la gasa. Los bordes de la malla de plástico se deberían extender aproximadamente 0,5-1,0 cm más allá de los bordes de la gasa.

La membrana enmarcada se levantó suavemente y se colocó en la plataforma del secador de calor en la parte superior de la malla de plástico con la cara de la membrana mirando hacia arriba. Esto se repitió hasta que la cantidad máxima de membrana (sin superar 300 cm^2) estuvo en la plataforma del secador de calor. (NOTA: la cara fetal del amnios se encontraba orientada hacia arriba).

Se cortó un trozo de film de PVC lo suficientemente larga como para cubrir toda la plataforma de secado del secador de calor más unos 30 cm (un pie) adicionales.

Con la bomba de vacío funcionando, toda la plataforma de secado del secador de calor se cubrió suavemente con la película de plástico dejando unos 15 cm (1/2 pies), extendiéndose más allá de los bordes de la plataforma de secado en ambas caras. Se procuró que la película se ajustara fuertemente contra la membrana y la lámina del marco (es decir, que se encontrase "succionada" por el vacío) y de que no hubiera fugas de aire ni arrugas sobre la superficie del tejido). Posteriormente, el párpado se cerró.

La bomba de vacío se ajustó a aproximadamente -559 mm (-22 pulgadas) de Hg de vacío. La calibración de la bomba se registró después de 2-3 min de ciclo de secado. La membrana se secó al vacío con calor durante aproximadamente 60 minutos. Aproximadamente a los 15-30 minutos del proceso de secado, la capa de gasa estéril se sustituyó en la secadora de calor con una nueva. El espesor total de la capa de gasa no debe superar un espesor de una gasa de 4 x 4 doblada.

Después del cambio, se procuró que la película de plástico se estirase fuertemente contra la membrana y la lámina del marco y que no hubiera fugas de aire ni ninguna arruga en la superficie de la membrana.

La integridad del cierre hermético al vacío se comprobó periódicamente comprobando el manómetro de la bomba. Después de finalizar el proceso de secado, se abrió el secador por calor y la membrana se enfrió durante aproximadamente dos minutos con la bomba funcionando.

Se creó un nuevo campo estéril con Steri-wrap estéril y una tabla de cortar de acero Inoxidable desinfectada debajo del mismo. En este punto se usaron guantes estériles. Con la bomba aún en marcha, la película de plástico se retiró suavemente de la lámina de membrana comenzando en la esquina y manteniendo la lámina de membrana hacia abajo con una mano enguantada. El bastidor se levantó suavemente con la membrana fuera de la plataforma de secado y se colocó en el campo estéril en la parte superior de la tabla de cortar de acero Inoxidable desinfectada con la cara de la membrana hacia arriba. Usando un bisturí, la lámina de membrana se cortó haciendo una Incisión a lo largo del borde de 1 - 2 mm más allá del borde del marco. La membrana se mantuvo en el lugar con una mano enguantada (guante estéril). Suavemente, la lámina de membrana se despegó del marco retirando lentamente y a continuación se colocó en el campo estéril en la tabla de corte.

Usando bisturí o tijeras afiladas, la lámina de membrana se cortó en segmentos de tamaño específico. Todos los trozos se cortaron y se fijaron en el campo estéril antes de su envasado. Se introdujo un solo trozo de membrana dentro de un recipiente; se puso de bolsa interna para abrir con una mano (estéril) a la vez que se mantenía la bolsa con la otra mano (no estéril). Se procuró no tocar los bolsillos con la mano 'estéril'. Cuando todos los trozos estuvieron dentro de las bolsas internas, éstas se cerraron herméticamente. Se fijó una etiqueta con la información apropiada (por ejemplo, n° de trozo, n° de lote, etc.) en la zona designada en la parte externa de la bolsa. Todos los trozos de membrana se procesaron de la misma manera. Los envases de bolsillo para abrir marcados y cerrados herméticamente se colocaron en la bolsa para cerrar con cremallera Impermeable para su almacenamiento hasta que estuvieran listas para transporte a la instalación o distribuidor para su esterilización. Todos los datos apropiados se registraron en el registro de procesamiento de tejidos.

Evaluación del biotejido de colágeno para hidratación/capacidad de sutura

Para generar una retroalimentación cualitativa y cuantitativa con respecto a la manipulación quirúrgica, periodos de hidratación y capacidad de sutura de los biotejidos comprendidos en la presente invención, se proporcionan para su evaluación muestras de membrana amniótica preparadas de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria a cuatro cirujanos experimentados especialistas en la cirugía de la superficie ocular. Las muestras fueron evaluadas por los cirujanos mediante la realización de injertos de tejido en muestras de ojo de cerdo para determinar las propiedades de manipulación quirúrgica y capacidad de sutura de los biotejidos de la invención.

Cada cirujano puede utilizar la metodología siguiente:

(1) el biotejido se seca por corte para ajustarse a un solo cuadrante del ojo del cerdo;

(2) el biotejido cortado se coloca en la superficie del ojo del cerdo;

(3) el biotejido se hidrata con solución salina estéril y se permite que el injerto se active, es decir, se vuelve a

hidratar, en el ojo del cerdo durante periodos de hidratación de 2, 5, 10 y 20 minutos;

(4) el biotejido se sutura al epitelio del ojo del cerdo con varios puntos de sutura de Vicryl 9-0; y

(5) los cirujanos tomaron notas cualitativas con respecto a la calidad del tejido, consistencia, y capacidad de sutura de la membrana amniótica hidratada.

La solicitud da a conocer entre otros los ítems siguientes (no todos forman parte de la invención). La invención se define en las reivindicaciones.

1. Un método para preparar un biotejido de colágeno a partir de una placenta que tiene una membrana amniótica y una membrana coriónica que comprende:

(a) separar la membrana amniótica de la membrana coriónica; y

(b) descelularizar la membrana amniótica de manera que la membrana amniótica se ponga en contacto con una enzima.

2. El método del ítem 1, que comprende además lavar y secar la membrana amniótica descelularizada.

3. El método del ítem 1, en donde la placenta es una placenta humana.

4. El método del ítem 1, en donde la placenta procede de una mujer que se ha sometido a cesárea o parto natural.

5. El método del ítem 1, en donde el método comprende adicionalmente la etapa de determinar que la membrana placentaria procede de un donante que ha sido sometido a ensayo para como mínimo una enfermedad transmisible.

6. El método del ítem 1, en donde el donante es una mujer.

7. El método del ítem 1, en donde la placenta se proporciona dentro de las 48 horas posteriores al parto.

8. El método del ítem 1, en donde el método comprende adicionalmente la etapa de almacenar la membrana amniótica durante máximo 72 horas después de la etapa (a) y antes de la etapa (b).

9. El método del ítem 8, en donde dicho almacenamiento comprende refrigerar la membrana amniótica obtenida en la etapa (a) durante máximo 5 días.

10. El método del ítem 1, en donde la descelularización de la membrana amniótica en la etapa (b) comprende eliminar todo el material celular visible y los residuos celulares de la membrana amniótica.

11. El método del ítem 1, en donde la descelularización de la membrana amniótica en la etapa (b) comprende la eliminación de todo el material celular visible y los residuos celulares de la cara materna de la membrana amniótica y de la cara fetal de la membrana amniótica.

12. El método del ítem 1, en donde la descelularización de la membrana amniótica en la etapa (b) comprende raspar físicamente dicha membrana.

13. El método del ítem 1, en donde la descelularización de la membrana amniótica en la etapa (b) comprende descelularizar la membrana amniótica con una solución que contiene detergente.

14. El método del ítem 13, en donde la solución que contiene detergente es una solución que comprende monohidrato de sal sódica de ácido desoxicólico al 0,01-1,0%.

15. El método del ítem 13, en donde el detergente en la solución que contiene detergente se selecciona de un grupo que consiste en detergentes no iónicos, Triton X-100, detergentes aniónicos y dodecilsulfato sódico o una combinación de los mismos.

16. El método del ítem 12, en donde dicho raspado físico comprende el raspado con un raspador celular.

17. El método del ítem 1, en donde la descelularización de la membrana amniótica en la etapa (b) se lleva a cabo en una solución estéril.

18. El método del ítem 2, en donde el lavado de la membrana amniótica se lleva a cabo en una solución estéril.

19. El método del ítem 2, en donde el secado de la membrana amniótica descelularizada se lleva a cabo a una temperatura de entre aproximadamente 35ºC y aproximadamente 50ºC.

20.Un método para preparar un laminado de membrana amniótica a partir de una placenta que tiene una membrana amniótica y una membrana coriónica que comprende:

(a) separar la membrana amniótica de la membrana coriónica;

(b) descelularizar la membrana amniótica; y

(c) formar capas de al menos dos de las membranas amnióticas descelularizadas en contacto entre sí de modo que se forma un laminado de membrana amniótica.

21. El método del ítem 20, que comprende además lavar la membrana amniótica descelularizada al menos una vez después de la etapa (b) y antes de la etapa (c).

22. El método del ítem 20, que comprende además secar el laminado de membrana amniótica descelularizada.

23. El método del ítem 20, que comprende adicionalmente ensamblar al menos dos de dichos laminados de membrana amniótica en un andamiaje tridimensional complejo.

24. Un biotejido de colágeno comprende una membrana amniótica humana deshidratada, descelularizada y libre de sustrato, en donde dicha membrana amniótica presenta una estructura terciaria y cuaternaria nativa.

25. Un biotejido de colágeno descelularizado y libre de sustrato que comprende colágeno, elastina y fibronectina.

26. Un biotejido de colágeno preparado mediante el método del ítem 1.

27. El biotejido de colágeno del ítem 24, en donde la membrana amniótica es una membrana amniótica humana.

28. El biotejido de colágeno de cualquiera de los ítems 24 a 26, en donde el biotejido presenta un grosor de entre aproximadamente 10 y 40 micrómetros.

29. El biotejido de colágeno de cualquiera de los ítems 24 a 26, en donde el biotejido se impregna adicionalmente con una o más biomoléculas.

30. El biotejido de colágeno del ítem 29, en donde la biomolécula se selecciona del grupo que consiste en antibióticos, hormonas, factores de crecimiento, agentes antitumorales, agentes antifúngicos, agentes antivíricos, medicaciones para el dolor, antihistamínicos, agentes antiinflamatorios, antiinfecciosos, agentes de cicatrización de heridas, sellantes de heridas, atrayentes celulares y reactivos de andamiaje.

31. El biotejido de colágeno del ítem 29, en donde el biotejido se impregna además con una o más moléculas pequeñas.

32. El biotejido de colágeno de cualquiera de los ítems 24 a 26, en donde el biotejido se llena adicionalmente con células, de manera que dichas células son uniformes y confluyentes.

33. El biotejido de colágeno del ítem 32, en donde las células son células madre humanas o células adultas diferenciadas humanas.

34. El biotejido de colágeno de cualquiera de los ítems 24 a 26, que comprende además uno o más agentes terapéuticos.

35. El biotejido de colágeno del ítem 34, en donde dicho agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en una hormona, un polipéptido, un antibiótico, un agente antifúngico y una enzima.

36. El biotejido de colágeno de cualquiera de los ítems 24 a 26, que comprende además uno o más composiciones de hidrogel.

37. El biotejido de colágeno del ítem 36, en donde la composición de hidrogel comprende un polímero seleccionado del grupo que consiste en alcohol de polivinílico, polietilenglicol, ácido hialurónico, dextrano, y derivados o análogos de los mismos.

38. Un andamiaje tridimensional que comprende el biotejido de colágeno de cualquiera de los ítems 24 a 26.

39. El andamiaje tridimensional del ítem 38, en donde el andamiaje es un tubo.

40. El andamiaje tridimensional del ítem 38, que comprende además una o más composiciones de hidrogel.

41. El andamiaje tridimensional del ítem 40, en donde la composición de hidrogel comprende un polímero seleccionado del grupo que consiste en alcohol polivinílico, polietilenglicol, ácido hialurónico, dextrano, y derivados o análogos de los mismos.

42. Un laminado de membrana amniótica producido mediante el método del ítem 20.

43. Un laminado de membrana amniótica que comprende al menos dos capas del biotejido de colágeno de

cualquiera de los ítems 24 a 26.

44. Un laminado de membrana amniótica que comprende el biotejido de colágeno de cualquiera de los ítems 24 a 26.

45. El laminado de membrana amniótica de cualquiera de los ítems 42 a 44, que comprende además una o más composiciones de hidrogel.

46. El laminado de membrana amniótica del ítem 45, en donde la composición de hidrogel comprende un polímero seleccionado del grupo que consiste en alcohol polivinílico, polietilenglicol, ácido hialurónico, dextrano, y derivados o análogos de los mismos.

47. Un injerto quirúrgico que comprende el biotejido de colágeno de cualquiera de los ítems 24 a 26.

48. Un método de uso del injerto quirúrgico del ítem 47 en un procedimiento quirúrgico, en donde dicho injerto quirúrgico se aplica directamente en el sitio quirúrgico del sujeto.

49. El método del ítem 48, en donde dicho sitio quirúrgico se selecciona del grupo que consiste en un ojo, piel, una superficie serosa del abdomen, una superficie serosa de la cavidad torácica, un pericardio seroso, una superficie mucosa de la cavidad oral, una superficie mucosa de la cavidad nasal, una superficie del tracto respiratorio, una superficie del tracto gastrointestinal y una superficie del tracto urogenital.

50. El método del ítem 48, en donde dicho injerto quirúrgico se aplica en un sitio interno del cuerpo del sujeto.

51. El método del ítem 48, en donde dicho injerto quirúrgico se aplica en un sitio externo del cuerpo del sujeto.

52. El método del ítem 48, en el que dicho sujeto es un ser humano.

53. Un método para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad ocular en un sujeto, que comprende aplicar el biotejido de colágeno de cualquiera de los ítems 24 a 26 sobre la superficie de un ojo enfermo del sujeto.

54. El método del ítem 53, en donde la enfermedad ocular se selecciona del grupo que consiste en ulceraciones/perforaciones, queratopatía bullosa, dermoides/tumores oculares, pterigión primario, defecto epitelial corneal persistente, quemaduras por álcali agudas y crónicas, quemaduras térmicas, aniridia, queratitis atópica, deficiencia de células madre limbales idiopática, pannus corneal, neovascularización, fusión corneal reumatoide, penfigoide cicatricial ocular, ampolla de filtración con fugas, tubo de la válvula de Ahmed expuesto, celulitis por *Serratia* en el simbléfaron posterior y síndrome de Stevenson Johnson agudo y crónico.

55. Un método de uso del biotejido de colágeno de cualquiera de los ítems 24 a 26 en procedimientos quirúrgicos seleccionados del grupo que consiste en cirugía oftálmica, cirugía cardiovascular, cirugía periodontal, cirugía neurológica, cirugía dental y cirugía ortopédica.

56. Un método de uso del biotejido de colágeno de cualquiera de los ítems 24 a 26 en la corrección de la incontinencia urinaria en un sujeto.

57. Un método de administración de un agente terapéutico en un sujeto, que comprende poner en contacto el sujeto con el biotejido de colágeno de cualquiera de los ítems 24 a 26.

58. El método del ítem 56 o 57, en donde el sujeto es un ser humano.

59. El método del ítem 57, en donde el agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en antibióticos, agentes anticáncer, agentes antibacterianos, agentes antivíricos, vacunas, anestésicos, analgésicos, agentes antiasmáticos, agentes antiinflamatorios, antidepresivos, agentes antidiabéticos, antipsicóticos, estimulantes del sistema nervioso central, hormonas, inmunosupresores, relajantes musculares y prostaglandinas.

60. Un método de uso del biotejido de colágeno de cualquiera de los ítems 24 a 26, en donde el tiempo de preparación del biotejido de colágeno comprende la hidratación del biotejido de colágeno.

61. El método del ítem 60, en donde la hidratación del biotejido comprende la hidratación con una solución salina estéril.

62. El método del ítem 60, en donde el biotejido se hidrata durante como mínimo 2 minutos antes del uso.

63. Un método de uso de un laminado de membrana amniótica que comprende además llenar el laminado con células vivas.

64. El método del ítem 63, en donde dichas células vivas se seleccionan del grupo que consiste en células de tejido adulto y células madre.

66. El método del ítem 64, en donde dichas células madre son pluripotentes.

67. El método del ítem 64, en donde dichas células madre son específicas de tejido.

68. Un método de tratamiento o prevención de una condición de la piel en un sujeto, que comprende poner en contacto dicha condición de la piel con el biotejido de colágeno de cualquiera de los ítems 24 a 26.

69. El método del ítem 68, en donde dicha condición de la piel se selecciona del grupo que consiste en una lesión de la piel, arrugas, líneas finas, adelgazamiento de la piel, elasticidad de la piel reducida, piel rugosa, cicatrices del acné, surcos glabelares, cicatrices de extirpación, defecto de los tejidos blandos, condición congénita de la piel, condición degenerativa de la piel, deficiencia de colágeno VII y piel dañada por el sol.

70. El método del ítem 68, que comprende además la administración de uno o más agentes terapéuticos en el sujeto para el tratamiento de una condición de la piel.

71. El método del ítem 70, en donde dicho o dichos agentes terapéuticos se seleccionan del grupo que consiste en vitaminas, minerales, preparaciones a base de catequinas y glucosamina.

72. Un método de tratamiento de una herida en un sujeto, que comprende poner en contacto dicha herida con un biotejido de colágeno de cualquiera de los ítems 24 a 26.

73. El método del ítem 72, en donde dicha herida se selecciona del grupo que consiste en una herida epidérmica, una herida de la piel, una úlcera de presión, una herida crónica, una herida aguda, una herida externa, una herida interna, una herida congénita, una herida por quemadura, una herida quirúrgica y una infección de herida.

74. Un método de tratamiento de una quemadura en un sujeto, que comprende poner en contacto dicha quemadura con un biotejido de colágeno de cualquiera de los ítems 24 a 26.

75. El método del ítem 74, en donde dicha quemadura se selecciona del grupo que consiste en quemadura de primer grado, quemadura de segundo grado, quemadura de tercer grado, una herida por quemadura infectada e impétigo en herida de quemadura.

76. El método del ítem 68, 72 o 74, en donde el sujeto es un ser humano.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un biotejido de colágeno para uso en cirugía, en donde dicho biotejido de colágeno comprende una membrana amniótica humana deshidratada, descelularizada y libre de sustrato, en donde dicha membrana amniótica presenta una estructura terciaria y cuaternaria nativa.

2. La composición para uso según la reivindicación 1, en donde la composición se utiliza como injerto quirúrgico.

3. La composición para uso según la reivindicación 1, en donde el biotejido de colágeno comprende elastina y fibronectina.

4. La composición para uso según la reivindicación 1 o 3, que comprende un laminado de membrana amniótica que comprende al menos dos capas del biotejido de colágeno.

5. La composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicha composición se aplica directamente a un sitio quirúrgico de un sujeto.

6. La composición para uso según la reivindicación 5, en donde dicho sitio quirúrgico se selecciona del grupo que consiste en un ojo, piel, una superficie serosa del abdomen, una superficie serosa de la cavidad torácica, un pericardio seroso, una superficie mucosa de la cavidad oral, una superficie mucosa de la cavidad nasal, una superficie del tracto respiratorio, una superficie del tracto gastrointestinal y una superficie del tracto urogenital.

7. La composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicha composición se aplica a un sitio interno del cuerpo de un sujeto, o a un sitio externo del cuerpo del sujeto.

8. La composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para uso durante una cirugía para evitar la fuga de sangre a partir de líneas de sutura, o para cubrir sitios de anastomosis durante la cirugía.

9. La composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para uso durante una cirugía intraperitoneal para evitar adherencias.

10. La composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para uso durante una cirugía cerebral para proporcionar soporte a la reparación dural.

11. La composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para uso como un sustrato para estimular la regeneración nerviosa en el sistema nervioso central y periférico.

12. La composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para uso en la reconstrucción de tejidos blandos para evitar adherencias en la reparación de articulaciones o tendones.

13. La composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el biotejido de colágeno se impregna con una biomolécula, preferiblemente un antibiótico, una hormona, un factor de crecimiento, un agente antitumoral, un agente antifúngico, un agente antivírico, un antihistamínico, un agente antiinflamatorio, un agente antiinfeccioso, plata elemental, una enzima bactericida, un agente de cicatrización de heridas, ácido hialurónico, un sellante de heridas, un atrayente celular o un reactivo de andamiaje.

14. La composición para uso según la reivindicación 13, en donde el antibiótico se selecciona del grupo que comprende clindamicina, minociclina, doxociclina y gentamicina.

15.La composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde el biotejido de colágeno se llena con células, preferiblemente células madre específicas de tejido, células progenitoras comprometidas, células fibroblastoides, condrocitos, hepatocitos, células hematopoyéticas, células parenquimatosas pancreáticas, neuroblastos y células progenitoras musculares.

16. Un injerto quirúrgico que comprende un biotejido de colágeno, en donde el biotejido de colágeno comprende una membrana amniótica humana deshidratada, descelularizada y libre de sustrato, en donde dicha membrana amniótica presenta una estructura terciaria y cuaternaria nativa.

FIG. 1

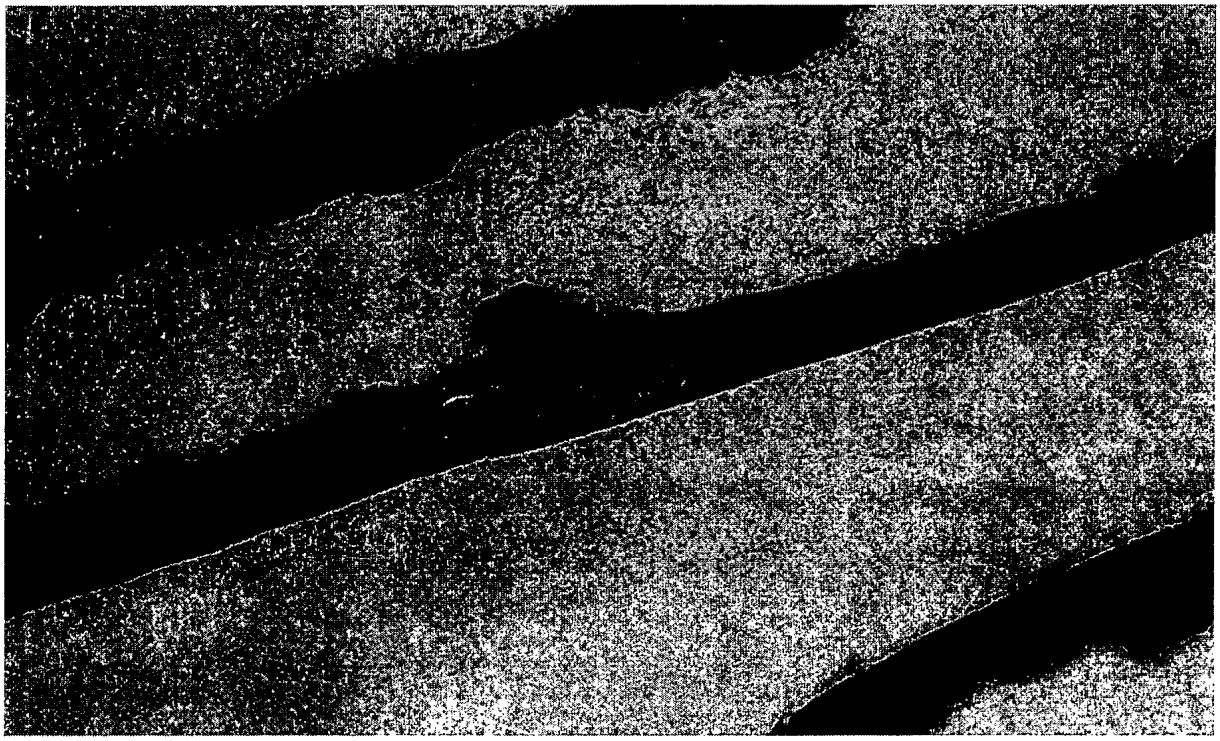

FIG. 2A

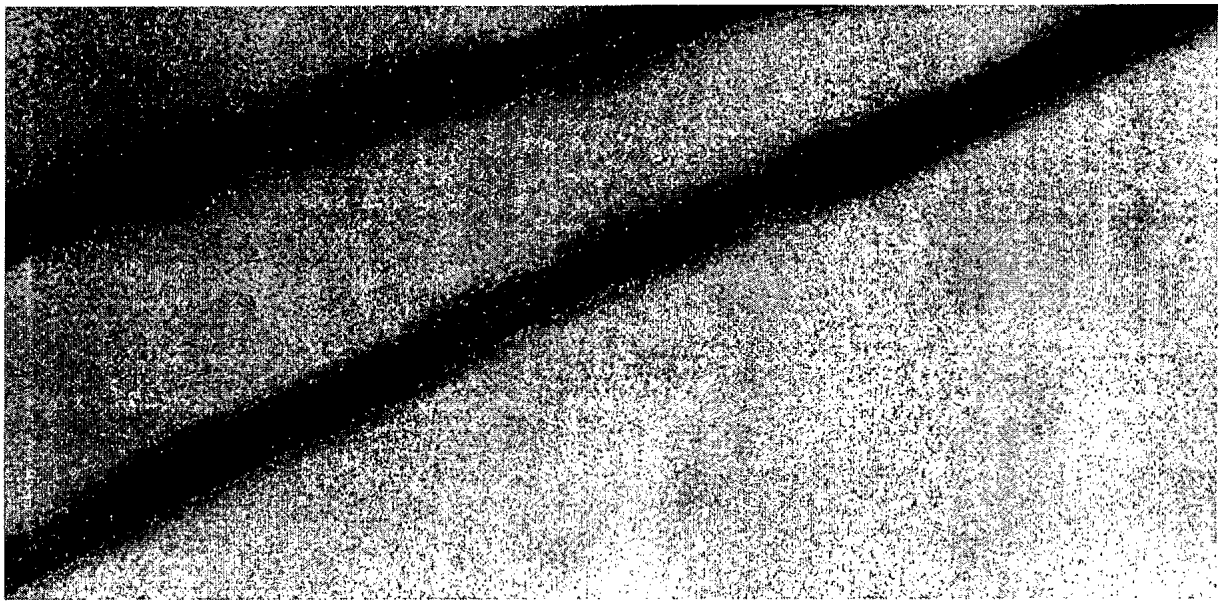

FIG. 2B

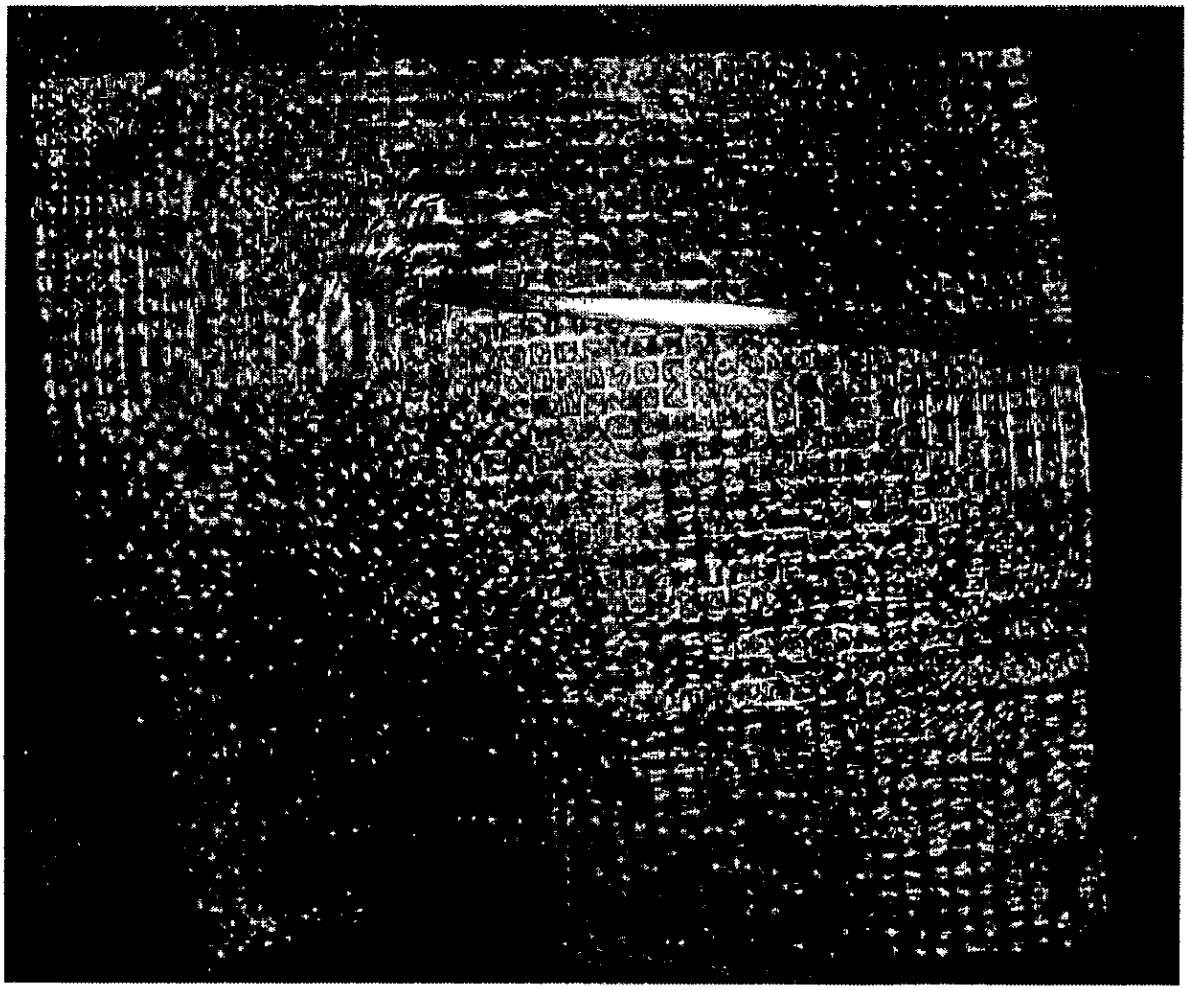

FIG. 3

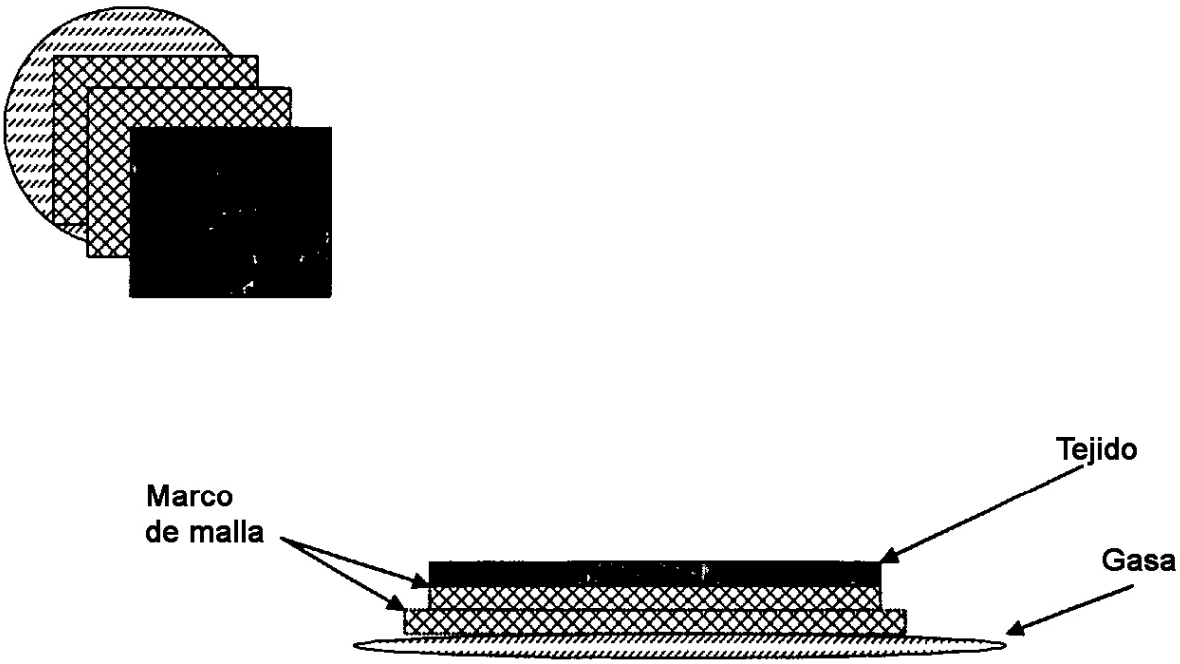

FIG. 4