

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 701**

51 Int. Cl.:

A61L 27/36 (2006.01)

A61K 35/12 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.03.2015 PCT/US2015/018421**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.09.2015 WO15142509**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.03.2015 E 15720818 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2019 EP 3119446**

54 Título: **Matriz pleural descelularizada**

30 Prioridad:

17.03.2014 US 201414215429

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

17.02.2020

73 Titular/es:

**ETHICON, INC (100.0%)
P.O. Box 151, U.S. Route 22
Somerville, NJ 08876, US**

72 Inventor/es:

**DHANARAJ, SRIDEVI;
VALMIKINATHAN, CHANDRA M.;
BUENSUCESO, CHARITO y
SEYDA, AGNIESZKA**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 742 701 T3

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

DESCRIPCIÓN

Matriz pleural descelularizada

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las matrices extracelulares derivadas biológicamente (ECM) se han usado para la reparación y regeneración de tejidos. Las dos matrices más comúnmente usadas, sin embargo, que se derivan de la dermis y el intestino delgado, tienen limitaciones. Estos tejidos siendo muy celulares, estando bien vascularizados, y asociados con el tejido adiposo requieren condiciones de procesamiento duras que pueden dañar la estructura de la ECM nativa. Las realizaciones de la presente invención superan uno o más de estos desafíos.

La WO9966967 describe un proceso para preparar un espécimen de tejidos blandos plegable que incluye los pasos de tratar los tejidos blandos nativos obtenidos de un donante aumentando gradualmente el gradiente de alcohol alifático u otro solvente orgánico polar miscible con agua adecuado hasta que la última solución de alcohol (u otro solvente) tenga por lo menos un 25% en volumen del líquido orgánico. Posteriormente, el espécimen de tejido se trata con una solución que contiene glicerol o polietilenglicol de bajo peso molecular (<1000D), y polietilenglicol de un peso molecular de entre aproximadamente 6.000 y 15.000 D y heparina. Posteriormente, el espécimen de tejido se sumerge brevemente en solución de heparina acuosa, se congela y se liofiliza.

La WO2013120082 describe un método para procesar un tejido que comprende los pasos de adquirir un tejido de mamífero que comprende por lo menos una parte de un tejido de la región pulmonar, seleccionar una muestra de tejido de la región pulmonar de por lo menos una parte de un tejido de la región pulmonar, y fijar la muestra de tejido de la región pulmonar usando un fijador, lo que da como resultado una muestra fijada. El paso de seleccionar una muestra de tejido de la región pulmonar puede comprender seleccionar una muestra de tejido de ligamento pulmonar del tejido de mamífero.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

La presente divulgación proporciona varias realizaciones ejemplares de la presente invención, algunas de las cuales se analizan a continuación.

La presente invención proporciona una matriz extracelular derivada biológicamente (MEC) que tiene una pluralidad de capas de tejido pleural descelularizado de acuerdo con la reivindicación 1. En una realización, el tejido pleural es de origen mamífero. En otra realización, el tejido pleural está derivado de porcino, bovino, ovino, canino, murino, simio, caprino, equino, aviar o humano. En otra realización más, la matriz está configurada como una lámina, una lámina perforada, láminas laminadas, tiras, piezas, una bobina, un cilindro, un tejido, un material prensado al vacío, una esponja, un polvo micronizado, una pasta, un gel inyectable, un spray, una emulsión, o un recubrimiento. Las matrices de la presente invención pueden usarse para reparar, reconstruir, sellar o unir tejido nervioso, tejido dérmico, tejido cardiovascular, tejido pericárdico, tejido muscular, tejido de vejiga, tejido ocular, tejido periodontal, hueso, tendones, ligamentos, tejido del suelo pélvico, o tejido abdominal

La matriz tiene una pluralidad de capas de tejido pleural descelularizado. En una realización, la matriz tiene una resistencia al estallido de por lo menos 8 N multiplicada por el número de capas. En otra realización, la matriz tiene una resistencia a la tracción de por lo menos 2 N multiplicada por el número de capas. En otra realización más la matriz tiene un espesor de no más de 0,105 mm multiplicado por el número de capas.

En una realización, la ECM que tiene tejido pleural descelularizado está compuesto por cuatro capas de tejido pleural descelularizado y tiene una elasticidad que se caracteriza por un módulo de flexión de no más de aproximadamente 363 MPa de media o aproximadamente 524 MPa incluyendo la desviación estándar y el módulo de flexión se mide por una prueba de flexión de 3 puntos. En otra realización, la matriz también tiene una ECM micronizada depositada en por lo menos una superficie de la ECM, la ECM micronizada comprendiendo micropartículas hechas de tejido pleural descelularizado. En esta realización, una pleura se microniza en una máquina de molienda, como es conocido por los expertos en la materia, y luego se aplica sobre la pleura descelularizada y se inmoviliza o une usando tratamiento térmico, compresión o un adhesivo biocompatible. En otra realización más, la matriz tiene por lo menos una capa de polímeros bioabsorbibles, en donde dichos polímeros bioabsorbibles son colágeno, gelatina, quitosano, celulosa oxidada, celulosa regenerada oxidada, copolímeros que contienen láctida, copolímeros que contienen glicólida, o combinaciones de los mismos.

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para elaborar una ECM derivada biológicamente de acuerdo con las realizaciones descritas en la presente. En la presente se divulga un método que implica proporcionar un tejido pleural; descelularizar el tejido pleural; y liofilizar el tejido pleural. También divulgado en la presente, el método implica el paso adicional de rehidratar el tejido pleural formando una ECM descelularizada.

El método de la invención implica proporcionar tejido pleural; descelularizar el tejido pleural; formar una

5 pluralidad de capas de tejido pleural del tejido pleural descelularizado; apilar la pluralidad de capas de tejido pleural una encima de la otra formando una pila; comprimir la pila al vacío; y liofilizar la pila comprimida, de acuerdo con la reivindicación 12. En otra realización, el paso de apilar la pluralidad de capas de tejido pleural una encima de la otra formando una pila se realiza con un lado seroso de las capas de tejido pleural mirando hacia arriba y un lado basal de las capas de tejido pleural orientado hacia abajo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 10 La Figura 1a ilustra un tejido pleural teñido antes de un lavado hipotónico.
- La Figura 1b ilustra tejido pleural teñido después de un lavado hipotónico.
- La Figura 1c ilustra tejido pleural teñido después de tratamiento con DNasa.
- 15 Las Figuras 2 y 3 ilustran la diferencia en el espesor, la cantidad de colágeno y elastina y la distribución entre los tejidos pleurales y el peritoneo. Las Figuras 2a, 2b y 2c ilustran el tejido pleural, y las Figuras 3a, 3b y 3c ilustran tejido del peritoneo.
- 20 La Figura 4 ilustra la translucidez de un control, un laminado de pleura de 4 capas, un laminado de peritoneo de 4 capas, un laminado de SIS (submucosa del intestino delgado) de 10 capas comercialmente disponible, y una dermis porcina comercialmente disponible, que es de una sola capa. El control fue el Alfabeto impreso sin ninguna superposición de material de ECM.
- 25 La Figura 5a es una imagen SEM que muestra las vistas superior, inferior y en sección transversal de la construcción de tipo de membrana basal de serosa pleural de la invención.
- La Figura 5b es una imagen SEM que muestra las vistas superior, inferior y en sección transversal de la construcción SIS.
- 30 La Figura 5c es una imagen SEM que muestra las vistas superior, inferior y en sección transversal de una matriz dérmica.
- La Figura 6 es una imagen SEM de las construcciones pleurales laminadas y liofilizadas de la invención, teñidas con hematoxilina y eosina (H&E), tricómico de Masson, Verhoeffs Van Gieson (EVG) y tinción con azul Alcian.
- 35 La Figura 7 ilustra una construcción pleural laminada y liofilizada de cuatro capas procesada a través del Reticulador de Tejido Brennan que da como resultado una matriz de pleura en malla.
- 40 La Figura 8 ilustra una construcción pleural laminada y liofilizada de cuatro capas procesada colocando entre dos superficies de acero inoxidable con bordes dentados romos y comprimiendo, lo que da como resultado una matriz de pleura texturizada.
- 45 La Figura 9a ilustra la pleura descelularizada de la invención (no laminada) construida para aplicaciones vasculares o neurales, con el lado de serosa orientado hacia el mandril para proporcionar una superficie interior de baja adherencia para la construcción.
- 50 La Figura 9b es una imagen SEM de la pleura descelularizada de la invención (no laminada) construida en una construcción tubular que muestra una construcción tubular bien formada con una superficie interior lisa y una superficie exterior rugosa.
- 55 La Figura 9c ilustra una pleura descelularizada de la invención (no laminada) construida para ser usada como un stent externo en los casos en que los vasos sanguíneos dañados o enfermos o los vasos de autoinjerto requieren soporte exterior.
- La Figura 10 ilustra una micrografía de fibroblastos sembrados en matriz de pleura con tinción viva/muerta (sondas moleculares). Células vivas teñidas de verde fluorescente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- 60 Ahora se hará referencia en detalle a las varias realizaciones de la presente divulgación. Esta invención está relacionada con una ECM derivada biológicamente que comprende tejido pleural descelularizado. Una de las razones de la escasez de biomateriales descelularizados derivados de la pleura es la dificultad para separar la pleura adherida a la cavidad torácica.
- 65

Las composiciones de ECM descelularizadas derivadas de tejido pleural pueden usarse para la reconstrucción, reparación y reemplazo, sellado de fugas, y unión de estructuras. La ECM comprende una pluralidad de capas de tejido pleural descelularizado.

5 La membrana pleural encierra los pulmones y consiste de una capa de células mesoteliales que residen sobre el tejido conectivo debajo del cual se encuentra un estroma de tejido colágeno con fibras elásticas. La ECM descelularizada de la pleura se distingue de otras ECM por la naturaleza de su función y tiene la ventaja sobre los materiales derivados dérmicos y submucosos debida a su baja celularidad, baja adiposidad y baja vascularidad. Tampoco contiene ninguno de los elementos glandulares que se ven en el tejido submucoso y dérmico. Estando derivada de la cavidad torácica, la membrana pleural tiene una menor carga biológica y, por lo tanto, puede someterse a metodologías de procesamiento menos duros. (La carga biológica se refiere al contenido bacteriano, y como la cavidad torácica tiene menos exposición a las bacterias que la dermis (derivada de la piel) y la SIS (derivada del intestino) es una matriz fuerte y, por lo tanto, no requiere reticulación adicional. El alto contenido de elastina en la membrana es beneficioso ya que acomoda la expansión y contracción del pulmón durante la respiración.

10 La ECM de membrana pleural puede ser de origen mamífero y puede obtenerse además de un grupo seleccionado que consiste de porcino, bovino, ovino, canino, murino, simio, caprino, equino, aviar y humano. En una realización, el tejido pleural de la ECM es de origen mamífero. En otra realización, la membrana pleural es de origen porcino.

15 La ECM derivada de la pleura se puede conformar y reconfigurar para usarla como una lámina, lámina perforada, láminas laminadas, tiras, piezas, una bobina, un cilindro, un tejido, un material prensado al vacío, una esponja, un polvo micronizado, una pasta, una pasta, un gel inyectable, un espray, una emulsión, o un recubrimiento. Las matrices compuestas mecánicas pueden producirse apilando capas de ECM una encima de la otra. La ECM pleural puede depositarse adicionalmente con una segunda ECM micronizada en la parte superior. También pueden lograrse matrices compuestas con otros polímeros bioabsorbibles sintéticos.

20 Las varias configuraciones de material descritas anteriormente pueden aplicarse a la reparación, reconstrucción, sellado de fugas, y unión de tejidos para una variedad de tejidos incluyendo tejido nervioso, tejido dérmico, tejido cardiovascular, tejido pericárdico, tejido muscular, tejido de vejiga, tejido ocular, tejido periodontal, hueso, tendones, ligamentos, reparación del suelo pélvico, tratamiento de la incontinencia, y reparación de la pared abdominal. Cuando se implanta en el sitio de reparación, la ECM pleural puede remodelarse e integrarse en el tejido de reparación.

25 En una realización, la ECM derivada de la pleura tiene una resistencia al estallido de por lo menos 8 N multiplicada por el número de capas. En otra realización, la ECM de la invención tiene una resistencia a la tracción de por lo menos 2 N multiplicada por el número de capas. En otra realización más, la ECM derivada de la pleura tiene un espesor de no más de 0,105 mm multiplicado por el número de capas. En otra realización más, la ECM de la invención comprende cuatro capas de tejido pleural descelularizado y tiene una elasticidad que se caracteriza por un módulo de flexión de no más de aproximadamente 363 MPa de media o no más de aproximadamente 524 MPa, incluyendo la desviación estándar, en donde el módulo de flexión se mide por una prueba de flexión de 3 puntos.

30 En una realización, la ECM derivada de la pleura comprende además una ECM micronizada depositada sobre por lo menos una superficie de la ECM, la ECM micronizada que comprende micropartículas hechas de tejido pleural descelularizado. En otra realización, la ECM de la invención comprende además por lo menos una capa de polímeros bioabsorbibles, en donde dichos polímeros bioabsorbibles son colágeno, gelatina, quitosano, celulosa oxidada, celulosa regenerada oxidada, copolímeros que contienen láctida, copolímeros que contienen glicólida, o combinaciones de los mismos.

35 La invención también proporciona un método para fabricar una ECM derivada biológicamente. El método comprende los pasos de: proporcionar tejido pleural; descelularizar el tejido pleural; liofilizar el tejido pleural; y formar una matriz a partir del tejido pleural liofilizado. En otra realización, el método comprende además el paso de rehidratar el tejido pleural formando una ECM descelularizada.

40 Otro método para elaborar una ECM derivada biológicamente comprende los pasos de: proporcionar un tejido pleural; descelularizar el tejido pleural; secar el tejido pleural formando un tejido pleural descelularizado desecado; formar una pluralidad de capas de tejido pleural del tejido pleural descelularizado desecado; apilar la pluralidad de capas de tejido pleural una encima de la otra formando una pila; comprimir la pila al vacío; y liofilizar la pila comprimida. En otra realización, el paso de apilar la pluralidad de capas de tejido pleural una encima de la otra formando una pila se realiza con un lado seroso de las capas de tejido pleural orientado hacia arriba y un lado basal de las capas de tejido pleural orientado hacia abajo.

45 Los siguientes ejemplos son ilustrativos de los principios y la puesta en práctica de esta invención, aunque no está limitada a los mismos.

50

Ejemplo 1: Obtención de tejidos y descelularización

Se obtuvo pleura porcina (aproximadamente 10 tejidos de pleura de 5 cerdos) de varias fuentes de animales incluyendo granjas específicas libres de patógenos. La pleura adquirida se recogió de cerdos, se limpió mecánicamente para eliminar el tejido adiposo adherente, se enjuagó en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y luego se envió en hielo mediante entrega durante la noche. Los métodos de limpieza mecánica de tejidos son conocidos por los expertos en la técnica. Un método que se usó para la preparación de la muestra fue un raspador romo para eliminar el tejido adherente. Después de recibir la pleura, las muestras se enjuagaron tres veces en PBS que contenía 0,1 por ciento de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y luego se almacenaron congeladas a -20 grados Celsius hasta que se procesaron. El tejido pleural se obtuvo de fuentes de tejido comerciales, Tissue Source de Lafayette, IN, y de Farm to Pharm de Warren, NJ. El tejido pleural de las Fuentes de Tejido era de cerdo libre de patógenos certificado.

El tejido pleural midió aproximadamente 30 cm (12 pulgadas) por 30 cm (12 pulgadas) y se descelularizó mediante descongelación a temperatura ambiente, y una vez descongelado se colocaron 4-5 pleuras en un matraz de Nalgene de 1 litro que contenía DPBS (-Ca, -Mg) y 0,1 por ciento de EDTA. Las pleuras se lavaron tres veces durante 30 minutos cada una con cambios en DPBS 0,1 por ciento EDTA. Para eliminar los componentes celulares, la pleura se transfirió a un nuevo matraz que contenía Tris-HCl 10 mM; pH 8,0; y se colocó en un agitador rotatorio con agitación suave a 4 grados Celsius durante 16 horas. Esto fue seguido por el tratamiento de la pleura con 1 por ciento de Triton X -100 en Tris-HCl 10 mM; pH 8,0 durante 24 h a 37 grados Celsius. Las muestras de pleura se transfirieron luego a un matraz nuevo que contenía 1:1 v/v Tris HCl 20 mM pH 8,0 y DPBS con Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺; y DNasa libre de RNasa durante 24 horas. Las muestras se lavaron 2 veces 30 minutos cada vez en PBS. Las muestras de pleura se trataron luego con cloruro de sodio (NaCl) 1,0 M, durante 1 hora a temperatura ambiente y seguidas de tres lavados adicionales en PBS. El régimen de lavado sirve para eliminar las células muertas, los desechos celulares, y los productos químicos residuales usados en los pasos de procesamiento anteriores. Al final del procesamiento, las muestras se desinfectaron mediante tratamiento con ácido peracético (PAA) al 0,15 por ciento en etanol al 20 por ciento durante 20 minutos y seguido de 3 lavados de 30 minutos en PBS.

Las muestras de pleura no fijadas se tiñeron con DAPI para visualizar los núcleos. La Figura 1a Muestra el tejido pleural antes del lavado hipotónico. LA Figura 1b muestra el tejido pleural después del lavado hipotónico, y la Figura 1c muestra el tejido pleural después del tratamiento con DNasa.

Ejemplo 2: Pleura y peritoneo

Se obtuvieron tejidos de pleura y peritoneo porcinos de la misma fuente animal. La pleura y el peritoneo adquiridos se limpiaron mecánicamente para eliminar el tejido adiposo adherente. Una de cada muestra se enjuagó tres veces en PBS que contenía ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 0,1 por ciento y luego se almacenó congelada a -20 grados Celsius hasta que se procesó. Las muestras se descongelaron y se fijó aproximadamente una pieza de 1 cm x 1 cm para histología. Las Figuras 2 y 3 ilustran la diferencia en el espesor, la cantidad de colágeno y elastina y la distribución entre los tejidos de la pleura y el peritoneo. Las Figuras 2a, 2b y 2c ilustran el tejido pleural, y las Figuras 3a, 3b y 3c ilustran el tejido del peritoneo. La Figura 2a es una sección transversal teñida con hematoxilina eosina de pleura y muestra el espesor de la pleura. Las Figuras 2b y 2c son cortes transversales de pleura teñidos con tricrómico y muestran distribución de colágeno y elastina. El colágeno se muestra en azul y la elastina se muestra en marrón. La Figura 3a es la sección transversal teñida con hematoxilina eosina del peritoneo y muestra el espesor del peritoneo. Las Figuras 3b y 3c son peritoneo teñido con tinción tricrómica y muestran la distribución de colágeno y elastina. El colágeno se muestra en azul y la elastina se muestra en marrón.

Se digirieron pesos iguales (25 mg) de tejido de pleura y de peritoneo procesados liofilizados con colagenasa o papaína. Se usaron 25 mg de colagenasa NB6 con agitación constante a 37 grados Celsius. Se usaron 100 u de papaína en 5 ml. Todas las soluciones fueron de 5 ml (en PBS estéril). La mayor parte del tejido era soluble en papaína y colagenasa. Para la pleura, el material insoluble de colagenasa fue de 6,4 mg y el material insoluble de papaína fue de 9,1 mg. Para el peritoneo, el material insoluble de colagenasa fue de 8,4 mg y el material insoluble de papaína fue de 13,7 mg.

Ejemplo 3: Laminación de pleura descelularizada

La membrana pleural por la naturaleza de su estructura tiene una lateralidad con dos superficies diferentes, el lado liso de serosa y el lado rugoso de la membrana basal (BM). La biomatriz pleural multicapa de la invención de construcción de tipo serosa y membrana basal, se construyó a partir del tejido pleural descrito en el Ejemplo 1 colocando la primera capa de membrana pleural con la superficie serosa orientada hacia abajo sobre una lámina de Teflón estéril y el lado de la membrana basal orientada hacia arriba, se colocó una segunda capa pleural con el lado de la membrana basal colocado sobre el lado BM de la primera capa. Se colocó una tercera capa de tal manera que el lado de serosa estaba sobre el lado de la serosa de la segunda capa. Se colocó una cuarta capa de tal manera que la capa de serosa estaba sobre el lado de BM de la tercera capa dando como resultado una construcción de 4 capas con un lado siendo el de serosa y el lado opuesto siendo la membrana basal dando como resultado una

construcción de superficie bimodal, es decir, un lado del constructo tenía la BM expuesta y el otro tenía el lado seroso expuesto. Se colocó una segunda lámina de Teflón estéril sobre la construcción. La construcción entera se colocó entre dos toallas de papel estériles y entre dos platinas de acero inoxidable. Luego se laminó la construcción al vacío (22 pulgadas de mercurio) y se aplicó presión (200001b) simultáneamente durante 6 horas a temperatura ambiente.

La biomatriz pleural multicapa de la invención de la construcción del tipo de membrana basal-membrana basal se construyó de una manera similar a la anterior, pero los lados superior e inferior de la construcción de 4 capas de la invención son los mismos: tanto ambas membranas serosas o ambas membranas basales. (En otro aspecto, también se contempla que se pueda crear una construcción de tejido multicapa superior a 4 capas).

En otra realización, la matriz de pleura se laminó con una malla sintética colocada entre dos o más capas pleurales. Para ensamblar el implante, se colocaron 2 capas de membrana pleural una sobre otra mientras se aseguraba que no quedaran burbujas de aire atrapadas entre las dos. Se colocó una malla sintética tejida (polipropileno) en el centro de las dos capas de la pleura superiores y se cubrió con dos membranas pleurales adicionales. Luego se laminó la construcción colocándola bajo presión y al vacío como se ha descrito anteriormente, formando un laminado compuesto.

(En realizaciones alternativas, se contempla que las capas de la membrana pleural también puedan suturarse juntas para lograr una estructura laminada. El laminado de la invención también puede lograrse mediante moldeado y/o reticulación de una lechada acuosa de membrana pleural pulverizada o micronizada sobre una membrana pleural seguida por la colocación de otra membrana sobre ella. Esto forma un polvo micronizado de pleura encapsulado entre la construcción de capas de pleura. La liofilización posterior de esta construcción usaría el material micronizado/pulverizado como agente de penetración y puente. La membrana pleural micronizada/pulverizada puede obtenerse descelularizando y liofilizando primero el tejido pleural. La membrana pleural liofilizada se pulverizaría o micronizaría luego mecánicamente usando cualquier tipo de dispositivo de molienda o picado y luego se suspendería en solución acuosa para formar una lechada.

Ejemplo 4: Liofilización y rehidratación de la construcción

Las construcciones como se han descrito anteriormente en el Ejemplo 3 se colocaron en un liofilizador al vacío y se liofilizaron. Las construcciones de pleura laminadas se secaron mediante el siguiente programa: la temperatura de la plataforma de liofilización se elevó a menos cuarenta (40) grados Celsius y se mantuvo durante 60 minutos, con el vacío ajustado a 500 mT. La temperatura de la plataforma se elevó luego a menos veinticinco (25) grados Celsius y se mantuvo durante 4 horas con el vacío ajustado a 100 mT. La temperatura se elevó luego a una temperatura de la plataforma de menos veinte (20) grados Celsius y se mantuvo durante 9 horas con el vacío ajustado a 50 mT. La temperatura se elevó luego a una temperatura de la plataforma de menos diez (10) grados Celsius y se mantuvo durante 4 horas con el vacío ajustado a 50 mT. Luego la temperatura se elevó a una temperatura de la plataforma de menos cinco (5) grados Celsius y se mantuvo durante 2 horas con el vacío ajustado a 50 mT. La temperatura se elevó luego a una temperatura de la plataforma de cero (0) grados Celsius y se mantuvo durante 90 minutos con el vacío ajustado a 50 mT. Luego la temperatura se elevó a una temperatura de la plataforma de diez (10) grados Celsius y se mantuvo durante 90 minutos con el vacío ajustado a 50 mT. Luego la temperatura se elevó a una temperatura de la plataforma de veinte (20) grados Celsius y se mantuvo durante 60 minutos con el vacío ajustado a 50 mT.

Después del secado, las construcciones de pleura laminadas se almacenaron a temperaturas de congelación superiores, óptimamente cuatro (4) grados Celsius en un ambiente protegido contra la luz. Antes de su uso, las construcciones se eliminaron y se rehidrataron mediante inmersión en una solución salina normal a de veinte (20) grados a treinta y siete (37) grados Celsius durante aproximadamente 2 minutos.

Ejemplo 5: Microscopía electrónica de barrido (SEM) de la construcción liofilizada laminada

La SEM se realizó en muestras de las construcciones pleurales laminadas y liofilizadas para confirmar la lateralidad de la matriz y para evaluar el efecto de la laminación y la liofilización sobre las matrices. Las muestras se analizaron mediante SEM. También se incluyó el laminado de 10 capas de la submucosa del intestino delgado (SIS) y la dermis porcina comercialmente disponibles por comparación.

Las imágenes de la SEM se muestran en las Figuras 5a-5c, mostrando las vistas superior e inferior, y las secciones transversales. La Figura 5a muestra la lateralidad distinta (diferencia en las características de superficie de las superficies superior e inferior) de la construcción de tipo de serosa-membrana basal de la pleura de la invención. La construcción de SIS, Figura 5b, no mostró diferencias en la superficie (no lateralidad) aparte del atributo de impresión superficial impartido probablemente durante la compresión. También la matriz dérmica, Figura 5c, no mostró diferencia en los dos lados (no lateralidad).

Las imágenes en sección transversal por SEM muestran las 4 capas de la construcción liofilizada laminada

(Figura 5a). Sorprendentemente, las capas no son tan distintas como en el espécimen de SIS (Figura 5b), indicando una amalgama de las 4 capas. También se observó interconectividad entre las capas en la construcción pleural. El SIS mostró las 10 capas distintas y no hubo amalgamación entre las capas (Figura 5b). Ventajosamente, la matriz pleural de la invención mostró porosidad, mientras que el SIS y la construcción dérmica son un material denso con poca porosidad (Figuras 5b y 5c, respectivamente).

Ejemplo 6: Histología de la construcción liofilizada laminada

Las construcciones pleurales laminadas y liofilizadas de la invención se fijaron en formalina tamponada neutra al 10 por ciento durante 24 horas, se enjuagaron, y se transportaron en PBS (solución salina tamponada con fosfato) estéril para la evaluación histológica. Las muestras se embebieron en parafina, se procesaron y luego se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E), Tricrómico de Masson, Verhoeffs Van Gieson (EVG) y tinción con azul Alcian, como se sabe en la técnica. En referencia a la Figura 6, la tinción con H&E y Tricrómico de Masson confirmó la efectividad del protocolo de descelularización, ya que no se pudieron visualizar células o fragmentos de células en ninguna región de la matriz procesada. Además, la estructura general de la ECM parecía estar bien conservada después del procesamiento. La tinción con EVG confirmó la conservación de la elastina que confiere propiedades únicas para la matriz. Además, la naturaleza suave del procesamiento fue evidente a partir de la retención de la tinción con azul Alcian para los proteoglicanos.

Sorprendentemente, como se confirma por obtención de imágenes de SEM, hay una amalgama completa de las 4 capas en la construcción de la invención que también se combina con una estructura de matriz abierta única de la construcción.

Ejemplo 7: Construcción de construcciones laminadas de la invención en formas implantables

Las construcciones pleurales laminadas y liofilizadas pueden procesarse para aplicaciones específicas. La matriz pleural puede hacerse porosa para permitir el transporte de fluidos. El tamaño, la forma, la organización y la densidad de los poros pueden variar y pueden crearse usando medios mecánicos o micromaquinado por láser controlado. Los poros también pueden crearse en el laminado no liofilizado y liofilizarse más tarde.

De acuerdo con una realización, las construcciones pleurales laminadas se procesaron a través de un Reticulador de Tejido Brennen (Brennen Medical, St. Paul, MN), para obtener una biomatriz de malla. En referencia a la Figura 7, una construcción pleural laminada y liofilizada de cuatro capas se procesó a través del Reticulador de Tejido Brennen dando como resultado una matriz de pleura en malla.

La construcción pleural laminada también puede texturizarse para mejorar las características de unión de una o ambas superficies dependiendo de la aplicación. En referencia a la Figura 8, se procesó una construcción pleural laminada y liofilizada de cuatro capas mediante el posicionamiento entre dos superficies de acero inoxidable con bordes dentados romos y compresión, dando como resultado una matriz pleural texturizada.

La pleura descelularizada (no laminada) también puede procesarse en construcciones tubulares. En una realización, la lámina de pleura descelularizada se envolvió sobre sí misma varias veces, formando una forma tubular. Se usó un mandril de acero inoxidable de 2 mm de diámetro y se cubrió con cinta de teflón de grado médico estéril con un saliente. La cinta de teflón proporciona una superficie no adherente para facilitar la eliminación fácil de la construcción una vez formada. La pleura descelularizada se envolvió fuertemente alrededor del mandril varias veces. Esto puede adaptarse en base al espesor y a la resistencia necesarios. Para hacer la construcción para aplicaciones vasculares o neurales, el lado de serosa se orienta hacia el mandril para proporcionar una superficie interna de baja adherencia para la construcción (Figura 9a). La construcción tubular se liofilizó luego al vacío siguiendo el método descrito en el Ejemplo 4. Después de la liofilización, la construcción se eliminó tirando del saliente de teflón para liberar la construcción. En referencia a la Figura 9b, las imágenes de SEM muestran una construcción tubular bien formada con una superficie interior lisa y una superficie exterior rugosa.

La construcción pleural tubular de la invención puede usarse como un stent externo en casos en los que los vasos sanguíneos dañados o enfermos o los vasos de autoinjerto requieren apoyo exterior. En este caso, la construcción tubular se elabora como se ha descrito anteriormente sin solapamiento, de tal manera que puede servir como una envoltura para un vaso o nervio, como se muestra en la Figura 9c.

Ejemplo 8: Siembra de células en la matriz pleural

La capacidad de la biomatriz de pleura de la invención para soportar la unión y proliferación celular se evaluó en experimentos de siembra de células. Para preparar la biomatriz de pleura para los experimentos de siembra de células, se enjuagaron punzones de biopsia de 10 mm de la pleura tanto sin procesar como después de la descelularización en PBS que contenía antibióticos, antimicóticos durante 20 minutos, 3 cambios para dejarlos limpios para el cultivo celular.

Cada punzón se colocó en un plato de grupos bajo de 24 pocillos. Se sembraron fibroblastos dérmicos porcinos (Pasaje 2) en la biomatriz pleural en el lado de la membrana basal con 60.000 células por punzón de 10 mm. Las células se sembraron en 60 microlitros de medio de crecimiento completo para promover la unión celular. Se dejó que las células se unieran durante 30 minutos antes de que los pocillos de cultivo se alimentaran con 1 ml de medio de crecimiento completo (37 grados Celsius, 5 por ciento de CO₂).

El medio de cultivo se cambió cada 2 a 3 días y, después de 1 semana de cultivo, se retiraron los andamiajes y se visualizaron mediante tinción viva/muerta (Sondas Moleculares). En referencia a la Figura 10, se muestra una micrografía de fibroblastos sembrados en matriz de pleura con tinción viva/muerta (Sondas Moleculares), por lo que las células vivas se tiñen de verde fluorescente. Los datos indican que los fibroblastos sembrados en la matriz pleural de la invención eran viables, haciendo la matriz adecuada para implantes.

Ejemplo 9: Propiedades mecánicas de la biomatriz de tejido pleural

La matriz pleural elaborada de acuerdo con la presente invención (Ejemplo 4), usando pleura derivada de la granja libre de patógenos, se investigó para su espesor y resistencia mecánica, tanto en pruebas de tracción como de flexión. Para pruebas mecánicas, se probaron matrices laminadas de 4 capas usando una celda de carga Instron 5544 (TJ-41), 45 kg (100-1b) (LC-147). Se probaron rectángulos de matriz hechos de la biomatriz pleural multicapa de la invención de la construcción tipo serosa y de membrana basal como se describe en el Ejemplo 3, que medían 6x1 cm para determinar la resistencia a la tracción, tanto húmedos como secos (GL = 2 cm, velocidad de la cruceta = 8 cm/min). Se utilizaron por lo menos seis (6) muestras. El módulo de flexión se determinó mediante una prueba de flexión de 3 puntos. Las muestras se evaluaron evaluadas secas. También se realizaron pruebas de tracción de sutura. Los resultados demostraron que la matriz pleural tiene buenas propiedades mecánicas que pueden adaptarse en base a la aplicación específica.

El peritoneo obtenido de la misma fuente se procesó de manera similar y se evaluó para su resistencia a la tracción. También se evaluó una matriz de capa porcina de SIS 10 disponible comercialmente para comparación. Tener en cuenta que la matriz pleural es más elástica y flexible que la matriz de SIS.

Tabla 1: Espesor de la matriz pleural y resistencia mecánica.

Material evaluado. Los laminados de pleura se elaboraron a partir de dos fuentes diferentes como se ha descrito anteriormente. Para comparación, los laminados de peritoneo se elaboraron a partir de la misma fuente. También se hicieron comparaciones contra una matriz de SIS de 10 capas y una matriz dérmica porcina. El espesor se midió en varios múltiples usando el calibre de altura federal.

Tabla 2: Espesor de las matrices.

Matriz (porcina)	Espesor (mm)
Laminado de 4 capas de pleura Fuente 1 (seca)	0.18±0.01
Laminado de 8 capas de pleura Fuente 1 (seca)	0.56±0.03;
Laminado de 4 capas de pleura o Fuente 2 (seca)	0.42±0.07
Laminado de 4 capas de peritoneo Fuente 2 (seca)	0.57±0.08
Laminado de SIS de 10 capas (seca)	0.15±0.01
Matriz dérmica (húmeda)	1.08±0.13

Como se puede ver en la Tabla 2, la matriz de la invención había logrado un espesor fácil de manejar y de aplicar, que no supera los 0,105 mm o menos multiplicado por el número de capas.

Resistencia a la tracción y módulo de tracción. La resistencia a la tracción evalúa la fuerza requerida para alargar y eventualmente romper el material. Se probaron rectángulos de la matriz de 6 x 1 cm para determinar su resistencia a la tracción en condiciones húmedas y secas. Las muestras húmedas se hidrataron en solución salina antes de la evaluación. La resistencia a la tracción es la fuerza a la que el material se rompe en dos piezas bajo carga de tracción. El módulo de tracción representa como de resistente es un material en relación con la resistencia a la deformación bajo carga de tracción.

Tabla 3: Resistencia a la tracción y módulo de tracción.

*Matriz (porcina)	SECO		MOJADO	
	Resistencia a la tracción (N)	Módulo de tracción (MPa)	Resistencia a la tracción (N)	Módulo de tracción (MPa)
Laminado de 4 capas de pleura Fuente 1	-	-	10.35±3.32	45.79±16.31

(continuación)

	SECO		MOJADO	
	Resistencia a la tracción (N)	Módulo de tracción (MPa)	Resistencia a la tracción (N)	Módulo de tracción (MPa)
5	*Matriz (porcina)			
	Laminado de 8 capas de pleura Fuente 1	-	37.21±16.24	30.24±11.24
10	Laminado de 4 capas de pleura Fuente 2	64.9±16.65	21.11±3.43	58.68±15.18
	Laminado de 4 capas de peritoneo Fuente 2	114.9±28.54	34.17±15.76	20.68±6.47
	Laminado de SIS de 10 capas	115.1±5.53		
15	Matriz dérmica	-	140.1±12.2	25.4±0.70
* Fuente 1 era tejido de Farm to Pharm. Fuente 2 era la Tissue Source que eran cerdos libres de patógenos. SIS era el producto de 10 capas. La matriz dérmica era dermis porcina.				

20 **Prueba de flexión de 3 puntos.** La prueba de flexión mide la rigidez o dureza del material. La prueba de flexión mide la fuerza requerida para doblar el material bajo condiciones de carga de 3 puntos. El módulo de flexión se usa como una indicación de la rigidez de un material cuando se flexiona. La carga de flexión es una carga que lleva a la deformación por flexión de un material. La carga de flexión máxima es la carga máxima que un material puede soportar bajo la carga de flexión. El módulo de flexión es una constante material que representa su resistencia a la deformación bajo flexión. Un valor pequeño significa alta flexibilidad.

Tabla 4: Prueba de flexión de 3 puntos.

	Carga de flexión máxima (N)	Módulo de flexión (MPa)	
30	Laminado de 4 capas de Pleura (usando material de Tissue Source, especificado anteriormente) (seco)	0.303±0.131	362.6±161.6
	Laminado de SIS de 10 capas disponible comercialmente (seco)	0.101±0.007	1867.8±395.3

35 Como se puede ver en la Tabla 4, el módulo de flexión de la matriz de la invención no era más de aproximadamente 363 MPa de media o no más de aproximadamente 524 MPa, incluyendo la desviación estándar, mientras que el material comparativo tenía un módulo de flexión más alto.

40 **Prueba de extracción de sutura.** Evalúa la fuerza de retención de la sutura para los materiales que requieren unión de sutura. Una prueba para medir la resistencia de un material para extraer la sutura del material después de aplicar una sutura a este material.

Tabla 5: Prueba de extracción de sutura.

	Extracción de sutura (kg)	
45	Laminado de 4 capas de pleura usando material de Tissue Source (especificado anteriormente) (seco)	1.42 ± 0.85 (3.12 ± 1.88 lb)
50	Laminado de 4 capas de pleura usando material de Tissue Source (especificado anteriormente) (húmedo)	2.23 ± 0.481 (4.98 ± 1.06 lb)

Presión de estallido. Se evaluó mediante la prueba de estallido de Mullen y evalúa la fuerza requerida para reventar la muestra.

Tabla 6: Prueba de resistencia al estallido (Determina la resistencia al estallido relativa de un material).

	Resistencia al estallido (N)	Resistencia al estallido (psi)	
55	Laminado de 4 capas de pleura usando material de Farm to Pharm (especificado anteriormente) (húmedo)	35.05±8.64	79.06±19.48
60	Laminado de 8 capas de pleura usando material de Tissue Source (especificada anteriormente) (húmedo)	69.10±30.75	155.82±69.35

Translucidez de las biomatrices (clínicamente relevantes). La translucidez de los biomateriales se evaluó mediante la capacidad de visualizar letras Arial de 28 puntos del alfabeto inglés impresas en rojo. Se cortaron

1X1 cm de los biomateriales y se colocaron secos y húmedos (después de la rehidratación en solución salina durante 20 minutos). Se capturaron imágenes para demostrar la translucidez del material como se ilustra en la Figura 4. El control fue el alfabeto impreso sin ninguna superposición de material de ECM.

5 **Velocidad de rehidratación (clínicamente relevante).** Se cortaron 1X1 cm de biomateriales y se colocaron en solución salina y se evaluó el tiempo de rehidratación mediante la rigidez al tacto. El laminado de pleura de 4 capas y el laminado de peritoneo de 4 capas se rehidrataron en 3 minutos. El SIS de 10 capas se rehidrató después de 20 minutos.

10

	Laminado de 4 capas de pleura Fuente 2	Laminado de 4 capas de peritoneo Fuente 2	Laminado de SIS de 10 capas
Tiempo de rehidratación	~3min	~3min	~ 15-20 min

15

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Una matriz extracelular derivada biológicamente (MCE) que comprende una pluralidad de capas de tejido pleural descelularizado.
- 2.** La ECM de la reivindicación 1, en donde la ECM tiene una resistencia al estallido de por lo menos 8 N multiplicado por el número de capas.
- 10 **3.** La ECM de la reivindicación 1, en donde la ECM tiene una resistencia a la tracción de por lo menos 2 N multiplicado por el número de capas.
- 4.** La ECM de la reivindicación 1, en donde la ECM tiene un espesor de no más de 0,105 mm multiplicado por el número de capas.
- 15 **5.** La ECM de la reivindicación 1, en donde la ECM comprende cuatro capas de tejido pleural descelularizado y tiene una elasticidad que se **caracteriza por** un módulo de flexión de no más de aproximadamente 363 MPa, en donde el módulo de flexión se mide mediante una prueba de flexión de 3 puntos.
- 20 **6.** La ECM de la reivindicación 1, en la que los tejidos pleurales son de origen mamífero.
- 7.** La ECM de la reivindicación 6, en la que el tejido pleural se deriva de porcino, bovino, ovino, canino, murino, simio, caprino, equino, aviar o humano.
- 25 **8.** La ECM de la reivindicación 1, en donde la ECM está configurada como una lámina, una lámina perforada, láminas laminadas, tiras, piezas, una bobina, un cilindro, un tejido, un material prensado al vacío, una esponja, un polvo micronizado, una pasta, un gel inyectable, un espray, una emulsión o un recubrimiento.
- 30 **9.** La ECM de la reivindicación 1, en la que el ECM comprende además una ECM micronizada depositada sobre por lo menos una superficie de la ECM, la ECM micronizada comprendiendo micropartículas hechas de tejido pleural descelularizado.
- 10.** La ECM de la reivindicación 1, en donde la ECM comprende además por lo menos una capa de polímeros bioabsorbibles, en donde dichos polímeros bioabsorbibles son colágeno, gelatina, quitosano, celulosa oxidada, celulosa regenerada oxidada, copolímeros que contienen láctida, copolímeros que contienen glicólida, o combinaciones de los mismos.
- 35 **11.** La ECM de la reivindicación 1, en donde la ECM es adecuada para su uso para reparar, reconstruir, sellar, o unir tejido nervioso, tejido dérmico, tejido cardiovascular, tejido pericárdico, tejido muscular, tejido de vejiga, tejido ocular, tejido periodontal, hueso, tendones, ligamentos, tejido del suelo pélvico, o tejido abdominal.
- 40 **12.** Un método para hacer una matriz extracelular derivada biológicamente (ECM), que comprende los pasos de:
- 45 proporcionar un tejido pleural;
descelularizar el tejido pleural;
formar una pluralidad de capas de tejido pleural del tejido pleural descelularizado;
apilar la pluralidad de capas de tejido pleural una encima de la otra formando una pila;
comprimir la pila al vacío; y
liofilizar la pila comprimida.
- 50 **13.** El método de la reivindicación 12, en donde el paso de apilar la pluralidad de capas de tejido pleural una encima de la otra formando una pila se realiza con un lado seroso de las capas de tejido pleural orientado hacia arriba y un lado basal de las capas de tejido pleural orientado hacia abajo.
- 55 **14.** El método de la reivindicación 12, que comprende además el paso de rehidratar el tejido pleural formando una ECM descelularizada.

FIG. 1A

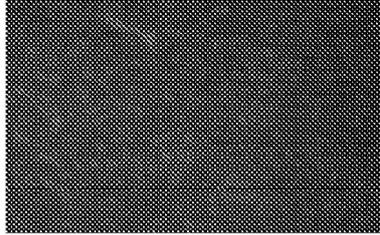


FIG. 1B

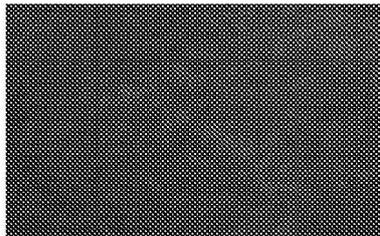


FIG. 1C

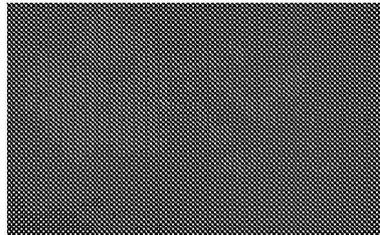


FIG. 2A

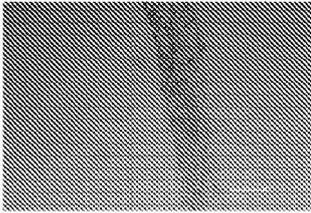


FIG. 2B

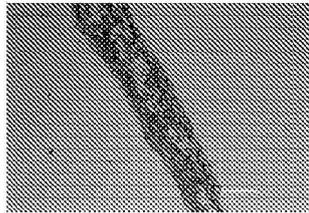


FIG. 2C

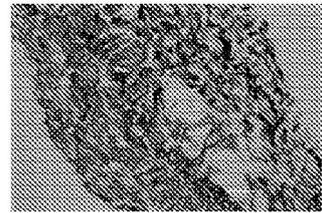


FIG. 3A

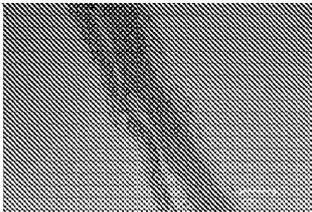


FIG. 3B

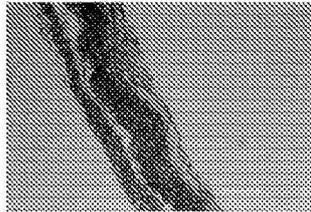


FIG. 3C

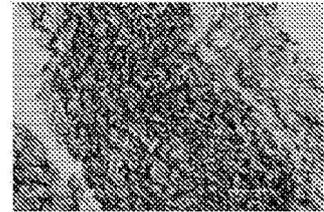


FIG. 4

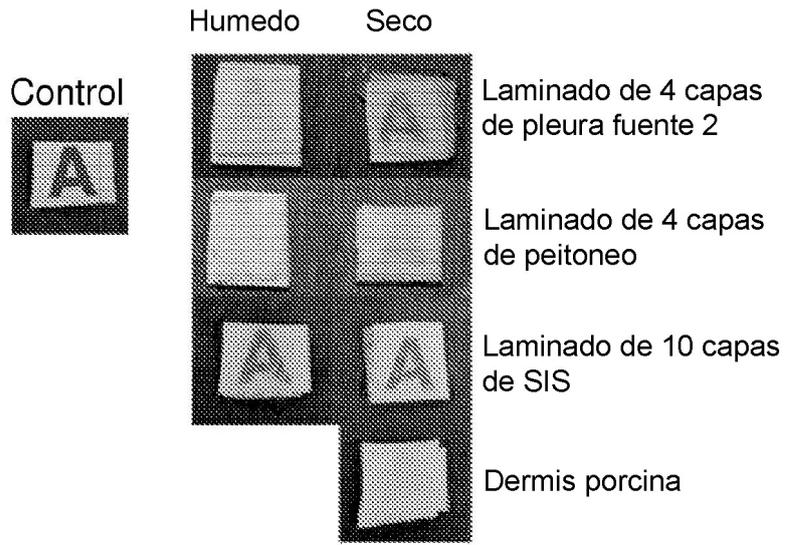


FIG. 5A

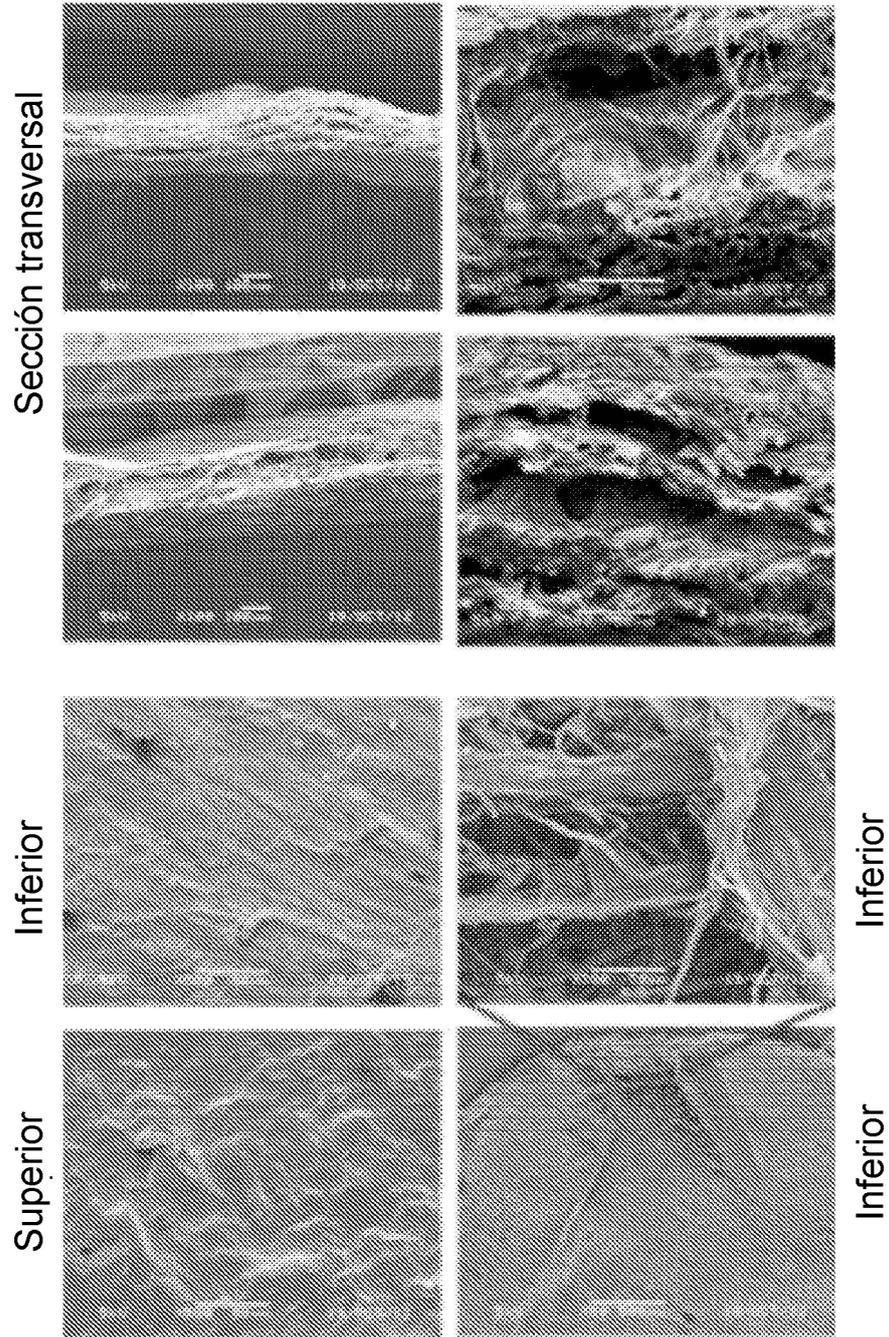


FIG. 5B

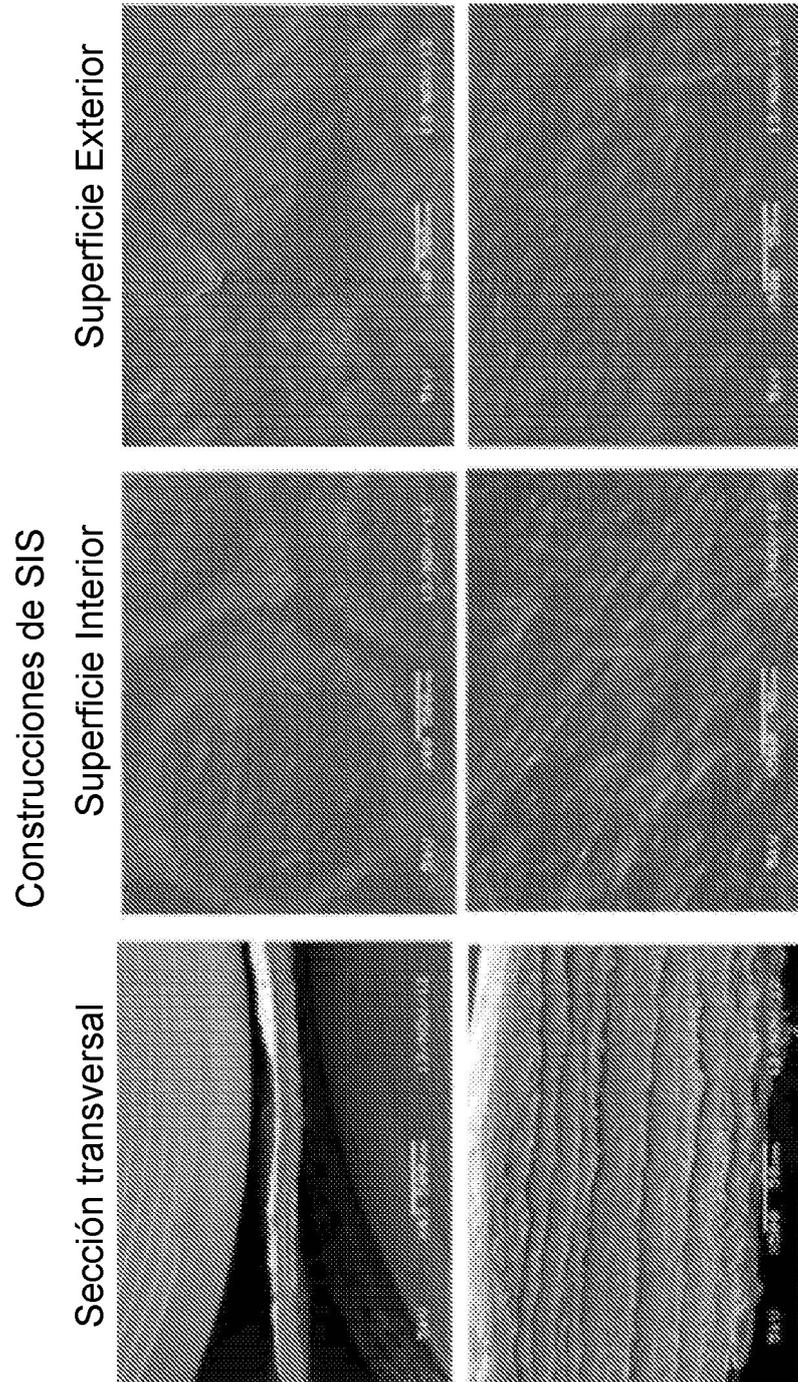


FIG. 5C

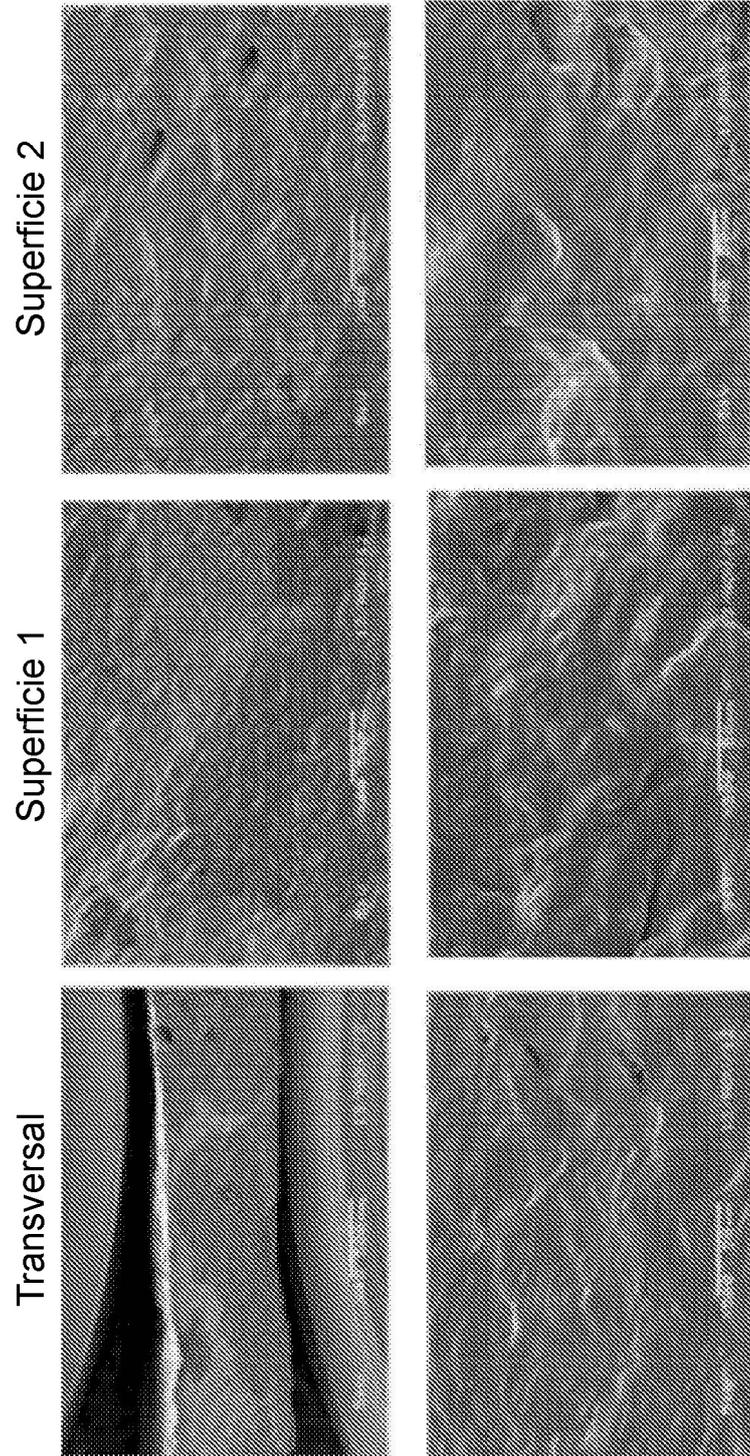


FIG. 6

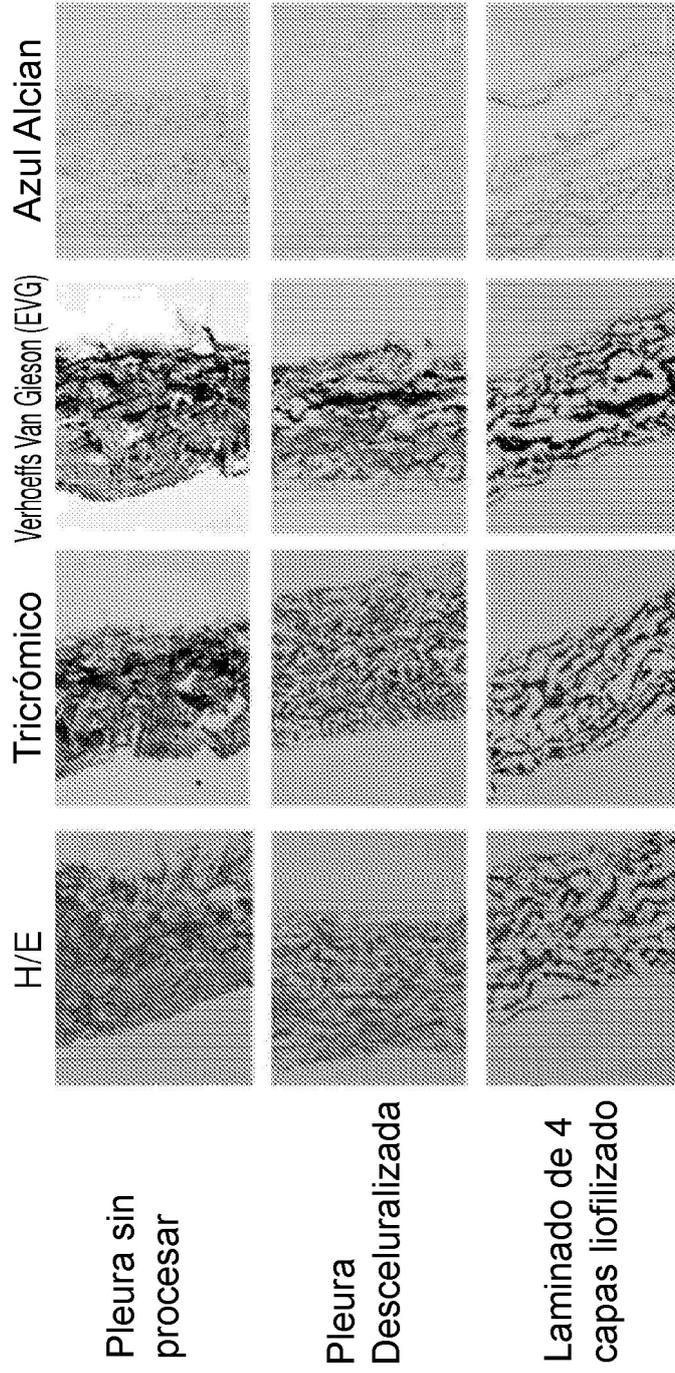


FIG. 7

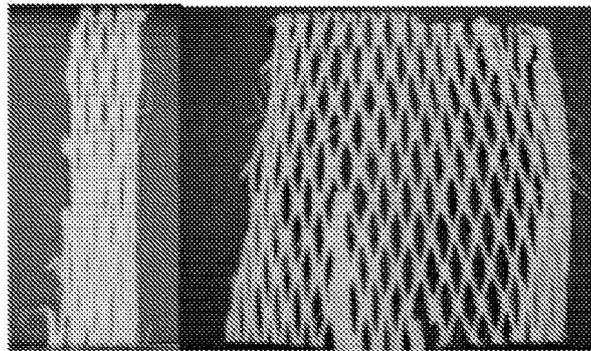


FIG. 8

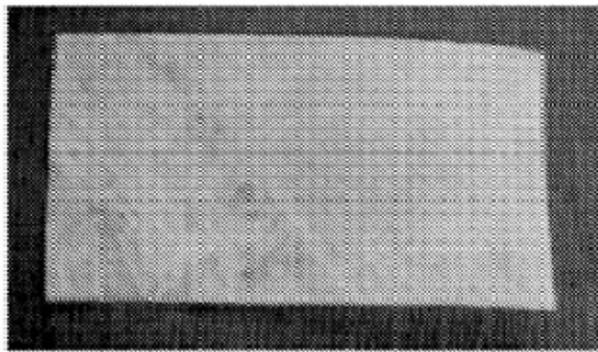


FIG. 9A

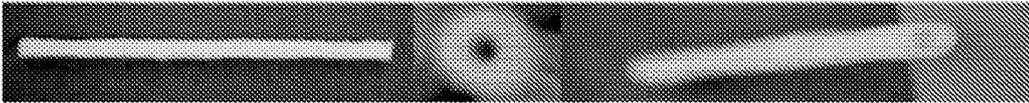


FIG. 9B

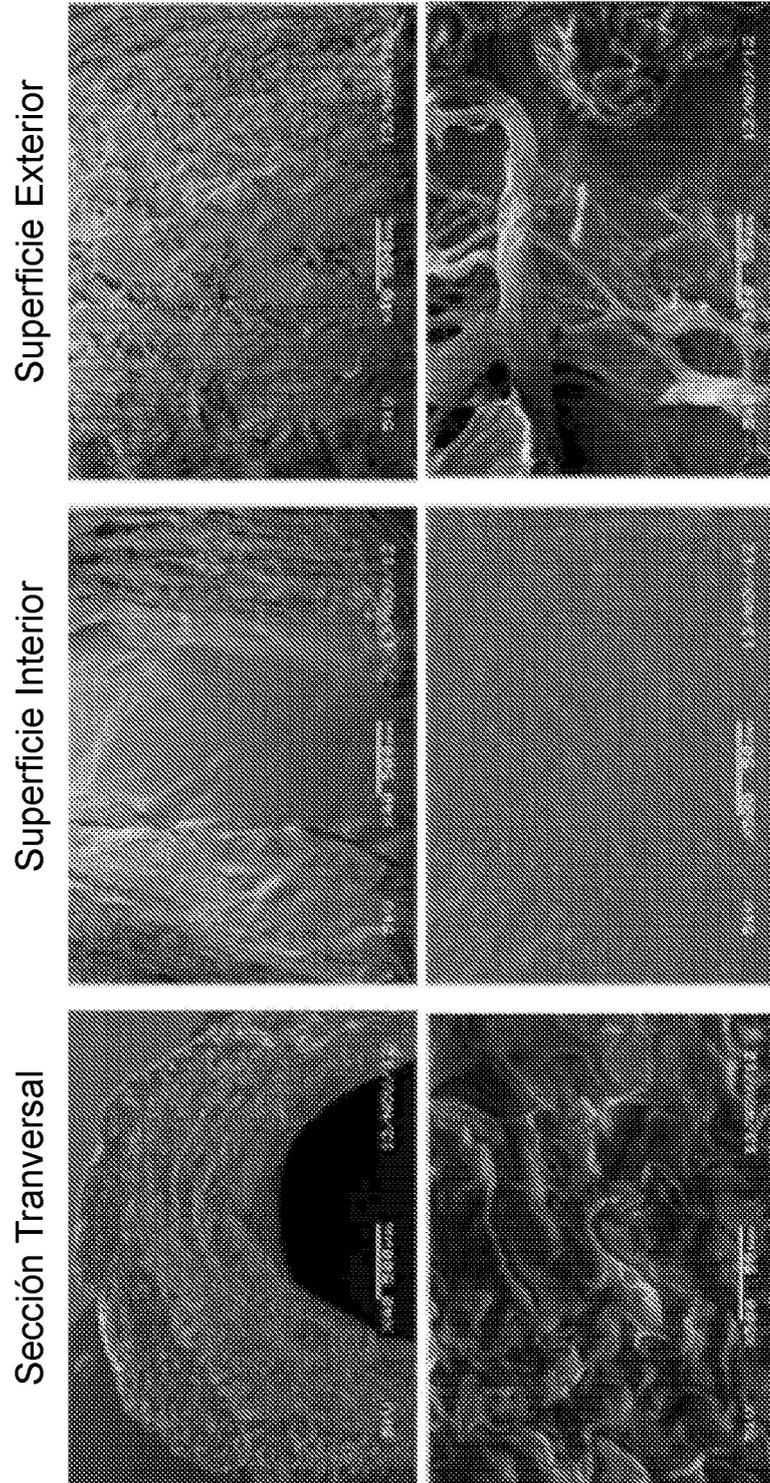


FIG. 9C

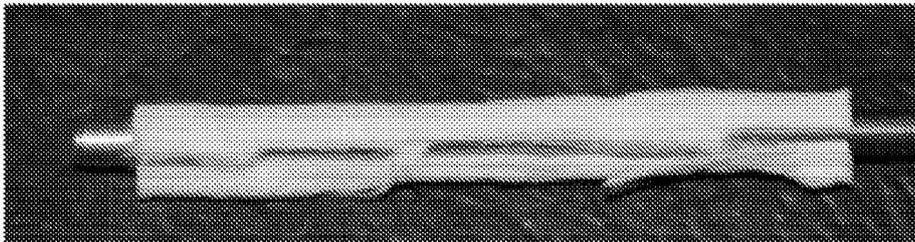
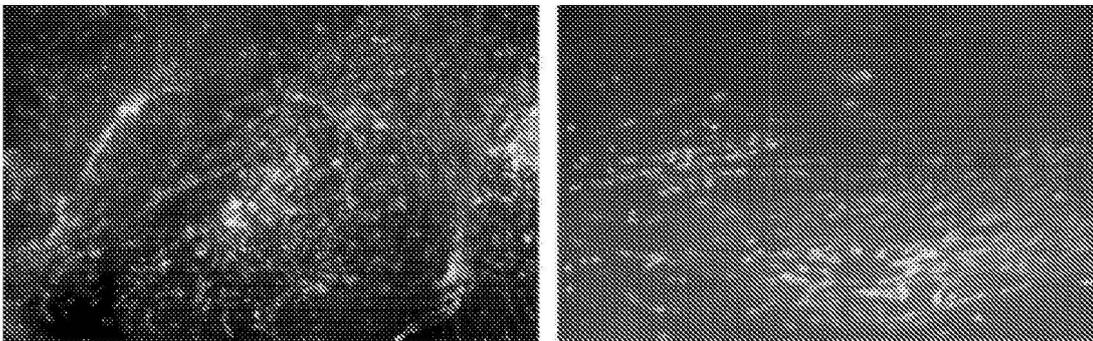


FIG. 10

Pleura sin procesar

Pleura procesada



Fibroblastos dérmicos porcinos sembrados