

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 801**

51 Int. Cl.:

A61L 27/36 (2006.01)

A61L 27/38 (2006.01)

A61K 35/38 (2015.01)

A61K 35/36 (2015.01)

A61K 35/22 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2000 E 09152183 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2019 EP 2055325**

54 Título: **Composición para regeneración de tejidos**

30 Prioridad:

22.12.1999 US 171733 P

18.10.2000 US 691590

18.10.2000 US 691345

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

23.03.2020

73 Titular/es:

**ACELL, INC. (100.0%)
6640 Eli Whitney Drive, Suite 200
Columbia, MD 21046, US**

72 Inventor/es:

SPIEVACK, ALAN R

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 749 801 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

Composición para regeneración de tejidos

Campo técnico

5 Esta invención se refiere a composiciones acelulares y desvitalizadas para la regeneración de tejidos, a métodos de preparación, y a métodos de uso.

Antecedentes de la invención

Los tejidos sub-mucosos de vertebrados de sangre caliente son útiles en materiales para el injerto de tejidos. Por ejemplo, las composiciones para injerto de tejidos sub-mucosos derivadas del intestino delgado se han descrito en la Patente de EE.UU. N° 4.902.508 (en lo sucesivo, la "patente '508") y en la Patente de EE.UU. N° 4.956.178 (en lo sucesivo, la "patente '178"), y se han descrito composiciones de injerto de tejidos sub-mucosos derivadas de la vejiga en la Patente de EE.UU. N° 5.554.389 (en lo sucesivo, la "patente '389"). Todas estas composiciones consisten, esencialmente, en las mismas capas de tejido y se preparan por el mismo método, siendo la diferencia en que el material de partida es, por una parte, intestino delgado, y vejiga, por otra. El procedimiento detallado en la patente '508, incorporada como referencia en la patente '389, y el procedimiento detallado en la patente '178, incluyen etapas de abrasión mecánica para separar las capas interiores del tejido, incluida al menos la porción luminal de la túnica mucosa del intestino o la vejiga, es decir, la lámina epitelial mucosa (epitelio) y la lámina propia, como se describe de forma detallada en la patente '178. La abrasión, descamación o rascado de la mucosa determinan la deslaminación de las células epiteliales y su membrana basal asociada, así como de la mayor parte de la lámina propia, al menos hasta el nivel de una capa de tejido conectivo denso y organizado, el estrato compacto. De esta forma, el material de injerto de tejido anteriormente reconocido como material de sustitución de tejido blando está exento de la membrana basal epitelial y consiste en la submucosa y el estrato compacto.

Sutherland, et al: "Regeneration of Bladder Urothelium, Smooth Muscle, Blood Vessels and Nerves Into an Acecellular Tissue Matrix", Journal of Urology, vol. 156, no. 2, 1 de Agosto de 1996, páginas 571 a 577.

El documento WO 99/32049 A1 se refiere a Injertos de matriz acelular y su preparación y uso.

25 La membrana basal epitelial es una delgada lámina de material extracelular contigua al aspecto basilar de las células epiteliales. Láminas de células epiteliales agregadas de tipo similar forman un epitelio. Las células epiteliales y su membrana basal epitelial asociada se encuentran situadas en la porción luminal de la túnica mucosa, y constituyen la superficie interna de los órganos y tejidos tubulares y huecos del cuerpo. Las células epiteliales y su membrana basal epitelial asociada se encuentran situadas, también, en la superficie externa del cuerpo, es decir, la piel. Ejemplos de un epitelio típico que posee una membrana basal incluyen, sin limitaciones, los siguientes: epitelio de la piel, intestino, vejiga, esófago, estómago, córnea, e hígado.

Las células epiteliales están situadas en la cara luminal o superficial de la membrana basal epitelial, opuestas a los tejidos conectivos. Los tejidos conectivos, o la submucosa, por ejemplo, están dispuestos en la cara abluminal o profunda de la membrana basal. Ejemplos de tejidos conectivos situados en la cara abluminal de la membrana basal epitelial son la submucosa del intestino y vejiga, y la dermis y tejidos subcutáneos de la piel.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona composiciones desvitalizadas regenerativas de tejidos que comprenden una membrana basal epitelial como parte de una matriz o soporte para la reparación o regeneración tisular. La inclusión de la membrana basal epitelial en composiciones desvitalizadas y regenerativas de tejidos de mamíferos tiene como resultado una mejor propagación *in vivo* de células endógenas y la restauración tisular en comparación con las matrices submucosas anteriormente descritas, que no incluyen una membrana basal epitelial. A los efectos de esta invención, el término desvitalizado significa acelular o sustancialmente acelular. A los efectos de esta invención, membrana basal epitelial significa, al menos, una porción de la membrana basal epitelial intacta.

45 De acuerdo con la reivindicación 1, una matriz desvitalizada preferida para la reparación o regeneración de tejidos de mamíferos comprende al menos una porción de una membrana basal epitelial de mamífero, preferentemente la membrana basal epitelial completa, y la túnica propia inmediatamente subyacente a la membrana basal. Matrices desvitalizadas de la invención restauran o sustituyen el tejido enfermo, defectuoso o ausente cuando se ponen en contacto con el tejido hospedador. En una realización preferida, la invención comprende una matriz desvitalizada adaptada para conformarse al tejido enfermo o defectuoso. En una realización particular, la matriz comprende una lámina de matriz derivada de la vejiga, del intestino, o de cualquier otro tejido epitelial de mamífero.

50 En otra realización, la matriz es inyectable gracias a su transformación en una emulsión, gel o extracto particulado fino. Una matriz según la invención puede actuar como vehículo para un producto farmacéutico. Una aplicación preferida de la matriz según la invención es la reparación o restauración de tejido cardíaco. En particular, una matriz o composición según la invención es de utilidad para restaurar o sustituir al menos una porción de una válvula

cardiaca, el tabique inter-auricular, el tabique inter-ventricular, o el miocardio. A los efectos de esta invención, matriz y composición son términos intercambiables.

5 En una realización, la invención consta de una composición desvitalizada que comprende una membrana basal epitelial y la túnica propia inmediatamente subyacente a la membrana basal. La membrana basal epitelial y la túnica propia inmediatamente subyacente a la membrana basal están deslaminadas de células de un epitelio de mamífero y de las porciones abluminales de la túnica propia. El tejido epitelial de mamífero utilizado en este aspecto de la invención deriva, preferentemente, de vejiga, intestino, o cualquier otro tejido epitelial de mamífero. Realizaciones adicionales constan de una composición adaptada para conformarse a una válvula cardiaca enferma o defectuosa tal como al menos una porción de una válvula pulmonar, válvula aórtica, válvula aurículo-ventricular derecha o izquierda, o el miocardio.

10 En todavía otra realización, una composición comprende membrana basal epitelial, túnica propia y submucosa. La membrana basal epitelial y la túnica propia están deslaminadas de células de un epitelio, y de la túnica muscular del tejido epitelial de un mamífero.

15 En todavía otra realización, una composición comprende membrana basal epitelial, túnica propia y células musculares lisas de la túnica muscular, todas ellas deslaminadas de células epiteliales de un epitelio de mamífero.

La composición comprende una o múltiples capas de un tejido epitelial en combinación con al menos una porción, preferentemente la totalidad de la membrana basal epitelial intacta.

20 En otro aspecto, se describen métodos para inducir la restauración o reparación de tejido cardiaco enfermo o defectuoso. Un método preferido de la invención comprende la etapa de poner en contacto un tejido hospedador con una matriz desvitalizada, derivada de un mamífero. La matriz desvitalizada comprende al menos una porción de una membrana basal epitelial y de la túnica propia inmediatamente subyacente a la membrana basal. En realizaciones preferidas, los métodos comprenden la inducción de la reparación endógena del epitelio utilizando composiciones regenerativas del tejido según la invención.

Breve descripción de los dibujos

25 Los dibujos no están realizados a escala, sino que, por el contrario, se presta especial atención en general a ilustrar los principios de la invención.

La Figura 1A es una vista en sección transversal de la pared intestinal.

La Figura 1B es una vista en sección transversal de la pared de la vejiga.

Descripción detallada de la invención

30 Una composición desvitalizada y regenerativa de tejido según la presente invención comprende membrana basal epitelial o al menos una porción de la membrana basal epitelial, y al menos la porción subyacente de la túnica propia recolectada del tejido epitelial de mamífero. Tejidos epiteliales preferidos para ser utilizados en la invención incluyen, sin limitaciones, tejido de la vejiga y otros tejidos de las vías urogenitales, intestino delgado, esófago y otros tejidos del tracto gastrointestinal, piel, hígado, y arterias tales como la aorta y otros tejidos del sistema cardiovascular. En una realización preferida, la invención proporciona una composición para injerto de tejido que comprende al menos una porción de la membrana basal epitelial y de la túnica propia subyacente, desprovista de las células epiteliales luminales, las capas adventicia abluminal, serosa y de músculo liso, y de las capas de tejido submucoso. Las técnicas de separación de tejidos o de deslaminación, según la invención, proporcionan una capa de material de matriz extracelular desvitalizada, que incluye membrana basal epitelial o, al menos, una porción de la membrana basal epitelial sustancialmente exenta de células. A continuación, se separa cualquier elemento celular residual mediante etapas de procesamiento adicionales tales como enjuague en solución salina hipotónica, ácido peracético o agua estéril.

45 En consonancia, con referencia a las Figuras 1A y 1B, una realización preferida de la invención comprende la membrana basal epitelial B y el tejido conectivo biotrópico conocido como túnica propia C, que se encuentra inmediatamente subyacente y situada en la cara abluminal de la membrana basal epitelial del intestino que se ilustra en la Figura 1A, o de la vejiga ilustrada en la Figura 1B, o cualquier otro tejido epitelial. Esta realización de la invención muestra la membrana basal epitelial B y porciones de la túnica propia C adyacente a la membrana basal epitelial B. La membrana basal epitelial B y la túnica propia C están deslaminadas de células epiteliales A, la submucosa D, la túnica muscular E y la serosa F. De esta forma, en esta realización de la invención, las porciones de la túnica mucosa H adyacente a la luz L, es decir, las porciones luminales de la túnica mucosa, forman una composición de matriz de tejido preferida.

50 En otra realización preferida, y haciendo referencia nuevamente a las FIGS. 1A y 1B, una composición según la invención comprende membrana basal epitelial B, túnica propia C y la túnica submucosa D. La membrana basal epitelial B, la túnica propia C y la túnica submucosa D están deslaminadas de células epiteliales A, túnica muscular

E y túnica serosa F. En esta realización, las porciones de la túnica mucosa H que incluyen la membrana basal epitelial, y la túnica submucosa, constituyen una composición de matriz de tejido preferida.

En todavía otra composición, una realización preferida de la invención comprende la membrana basal epitelial B, la túnica propia C que se encuentra en posición subyacente a la membrana basal epitelial B, la túnica submucosa D y al menos una porción de la túnica muscular E.

Fuentes de tejido epitelial

El material para las composiciones de regeneración tisular según la invención se prepara, típicamente, a partir de tejidos procedentes de animales criados para la producción de carne, incluidos, sin limitaciones, cerdos, ganado vacuno y ovino. Otros vertebrados de sangre caliente son también útiles como fuentes de tejido, pero la mayor disponibilidad de estos tejidos a partir de animales usados en la producción de carne hace que estos tejidos sean preferidos. Existen, en consecuencia, fuentes comerciales económicas de tejido para usar en la preparación de composiciones tisulares de acuerdo con la presente invención. Puede haber razas especialmente criadas o manipuladas por ingeniería genética de determinadas especies que se utilizan como fuentes de tejido. Por ejemplo, los cerdos tratados por ingeniería genética para estar exentos de galactosilo, alfa-1,3-galactosa (epitopo GAL), se pueden usar como fuente de tejidos para la producción de la composición. De manera alternativa, piaras de cerdos criados para estar exentos de patógenos específicos, se pueden utilizar como fuente de tejidos. El tejido de mamífero empleado como fuente de tejido para la fabricación de la composición según la invención se puede recolectar de animales de cualquier grupo de edad, incluido tejido embrionario, peso de mercado, sexo o fase de madurez sexual.

Fuentes de tejido de membrana basal epitelial

Vejiga

Una fuente preferida de membrana basal epitelial es la vejiga, ilustrada en la Figura 1B, de vertebrados de sangre caliente tales como cerdos. De los componentes de la membrana basal epitelial se derivan excelentes propiedades de remodelamiento biológico del tejido, que sirven de soporte y estímulo para el crecimiento celular sin invasión, y de la matriz de la túnica propia, que permite y fomenta la adhesión, crecimiento y diferenciación celular endógena. La matriz, a la que se hará referencia en lo sucesivo como matriz vesical (UBM, en sus siglas en inglés), incluye la membrana basal epitelial B del epitelio vesical y la túnica propia C subyacente. En esta realización, la membrana basal epitelial B y la túnica propia C subyacente se encuentran deslaminadas de las células epiteliales A y de la matriz extracelular de la túnica submucosa D, la túnica muscular E, y la túnica serosa F. La UBM se obtiene a partir de cualquier vertebrado de sangre caliente, pero de forma muy preferida, se hace a partir de cerdos. La UBM se utiliza como soporte biológico para la reparación o restauración de tejidos y órganos corporales tales como estructuras músculo-esqueléticas y cardiovasculares, tejidos dermatológicos y gastrointestinales, tejidos urogenitales y reproductivos, tejidos neurológicos, hígado, riñón, y tejidos de cabeza y cuello.

Una composición regenerativa de tejido UMB preferida comprende membrana basal epitelial, preferentemente membrana basal epitelial de la vejiga, y la estructura molecular biotrópica que se encuentra situada en posición subyacente inmediata a la membrana basal epitelial del tejido vesical de vertebrados de sangre caliente. En esta realización, la membrana basal epitelial está deslaminada de células epiteliales luminales, tejido adventicio abluminal, serosa y tejidos musculares lisos, y de tejido submucoso. Las composiciones para injertos de tejidos según la invención exhiben características de crecimiento tisular marcadamente superiores en comparación con las composiciones submucosas para injerto de tejidos que se han descrito anteriormente, implantadas o inyectadas en un hospedador vertebrado para producir la reparación o la sustitución de tejidos u órganos dañados, ausentes o defectuosos.

Los métodos descritos evitan la pérdida completa de la membrana basal epitelial, y dan como resultado una composición regenerativa de tejidos que incluye al menos una porción de la membrana basal epitelial. En una realización preferida, la membrana basal epitelial está sustancialmente intacta, según se determina mediante técnicas histoquímicas o inmuno-histoquímicas convencionales, y por microscopía óptica o electrónica. El material desvitalizado resultante, obtenido por los métodos descritos, contrasta con los métodos utilizados para preparar composiciones para injerto de tejidos, derivadas del intestino delgado o de la vejiga, que se han descrito en las patentes '508 y '389, que dan como resultado un material de injerto que incluye submucosa exclusiva de la membrana basal epitelial. Las etapas usadas en la preparación de UBM a partir del tejido vesical difieren de las etapas anteriormente descritas para la preparación de composiciones submucosas para el injerto de tejidos que se describen en las patentes '508 y '389. En los métodos para preparar la composición submucosa para el injerto de tejidos descritos en las patentes '508 y '389, la mucosa se separa de forma mecánica, por abrasión.

La UBM se prepara mediante la separación de tejido de la vejiga de un vertebrado de sangre caliente, por ejemplo un cerdo, y deslaminar el tejido, empapándolo, en primer lugar, en una solución de desepitelización, por ejemplo, una solución salina hipertónica, de forma especialmente preferida, solución salina 1,0 N, durante periodos de tiempo comprendidos en el intervalo de 10 minutos a 4 horas. La exposición a una solución salina hipertónica separa de manera eficaz las células epiteliales de la membrana basal epitelial subyacente. El tejido remanente tras el

procedimiento inicial de deslaminación incluye la membrana basal epitelial y las capas de tejido abluminal hasta la membrana basal epitelial. Seguidamente, este tejido se somete a tratamiento adicional para separar la mayoría de tejidos abluminales, pero no la membrana basal epitelial. Se separan los tejidos serosos, adventicios, muscular liso, la submucosa y la porción abluminal de la túnica propia del tejido desepitelizado remanente por abrasión mecánica, o mediante una combinación de tratamiento enzimático, hidratación y abrasión. Se logra la separación mecánica de estos tejidos por medio de la separación de los tejidos mesentéricos con, por ejemplo, fórceps de Adson-Brown y tijeras Metzenbaum, y retirando por frotación la túnica muscular y la túnica propia abluminal, aplicando un movimiento longitudinal de frotación con el asa de un escalpelo u otro objeto rígido envuelto en una gasa húmeda. Después de separar estos tejidos, el soporte tisular resultante consiste en membrana basal epitelial y la túnica propia subyacente. Este tejido difiere de las composiciones tisulares anteriormente conocidas, derivadas de tejidos epiteliales de animales, por la inclusión de una membrana basal epitelial básicamente intacta en la presente invención. Los tejidos se pueden procesar, adicionalmente, mediante enjuague con solución salina hipertónica, ácido peracético o agua estéril. Asimismo, se pueden usar otros métodos para separar capas de tejido, por ejemplo, un micrótopo, para obtener la composición tisular de la invención.

El método para preparar las composiciones regenerativas de tejidos no está limitado al uso de tejido vesical como material de partida. El método es aplicable también a otros tejidos de partida, por ejemplo, tejidos de piel, esófago, estómago e intestino.

Después de preparar la UBM, la estructura tisular resultante consiste en un material con un grosor de aproximadamente 10-120 micrómetros formado principalmente (es decir, en más de 90%) por matriz extracelular (ECM, en sus siglas en inglés) que incluye la membrana basal epitelial. Este material puede conservar o no algunos de los elementos celulares que formaban parte del tejido original tales como células del endotelio capilar o fibrocitos. Estos elementos celulares se separan por la subsiguiente exposición a ácido peracético como parte de la desinfección de este material biológico. El material difiere en su aspecto histológico y en su arquitectura de las composiciones submucosas para el injerto de tejidos debido a la membrana basal epitelial lisa que delimita la superficie luminal, y la ECM colágena, densa y parcialmente organizada, que delimita la superficie abluminal. El material ECM adquiere un tono rosa con la tinción H+E y azul con la tinción tricrómica de Masson.

Piel, esófago

De manera similar, las etapas usadas en la preparación de composiciones regenerativas de tejidos a partir de otros órganos epiteliales que poseen capas de tejido similares a la vejiga, tales como piel, o esófago, son semejantes a las etapas descritas anteriormente para preparar UBM. Al igual que la matriz vesical, el material remanente tras la separación de las células epiteliales, la túnica serosa, la túnica muscular y la túnica propia abluminal, incluye al menos una porción de la membrana basal epitelial, y la túnica propia adyacente.

Intestino delgado

También se deriva una composición regenerativa de tejidos según la invención a partir de los tejidos epiteliales del tracto gastrointestinal tales como del intestino delgado. Las etapas usadas en la preparación de una composición regenerativa de tejidos que incluye al menos una porción de la membrana basal epitelial del intestino delgado, y la túnica propia subyacente, denominada SIM (en sus siglas en inglés), son similares a las etapas descritas anteriormente para la formación de UBM. Se puede utilizar solución salina 1,0 N para separar las células del epitelio intestinal de la membrana basal epitelial. Un método alternativo para separar las células epiteliales consiste en empapar el tejido epitelial en un detergente tal como un detergente no iónico, por ejemplo, Triton X-100, a concentraciones de 0,025 a 1%, durante 5 minutos hasta varias horas.

En una realización, la composición deslaminada regenerativa de tejido derivada de un tejido epitelial, se almacena en estado hidratado congelado o se seca al aire a temperatura ambiente y, a continuación, se almacena. De manera alternativa, la composición regenerativa de tejido se liofiliza y almacena en estado deshidratado a temperatura ambiente o congelada. En todavía otra realización, la composición regenerativa de tejido se puede triturar y fluidificar mediante la digestión del material en proteasas, por ejemplo, pepsina o tripsina, durante periodos de tiempo suficientes para solubilizar el tejido y formar una solución sustancialmente homogénea. La viscosidad del material solubilizado se puede variar ajustando el pH para producir un gel, un gel-sol, o un estado completamente líquido. La preparación de submucosa intestinal fluidificada se describe, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. N° 5.275.826.

En todavía otra realización, la presente invención contempla el uso de formas en polvo de la composición regenerativa de tejido. En una realización, se produce una forma en polvo de la composición regenerativa de tejido triturando o moliendo el material deslaminado para producir partículas cuyo tamaño se encuentra dentro del intervalo de 0,005 mm² hasta 2,0 mm². El material, deslaminado de las capas tisulares no deseadas, se congela, por ejemplo en nitrógeno líquido, para llevar a cabo el procedimiento de trituración. De manera alternativa, el material se deshidrata para efectuar el procedimiento de trituración. A continuación, la forma triturada del material se liofiliza para formar una composición regenerativa de tejido particulada y anhidra.

Las composiciones tisulares de la presente invención son adecuadas para numerosas aplicaciones quirúrgicas y no quirúrgicas destinadas a inducir la cicatrización reconstructiva de heridas y la restauración de tejidos. Por ejemplo,

se les utiliza para sustituir válvulas cardiacas, arterias, venas, vejigas, hígados, porciones del tracto gastrointestinal dañados, enfermos o ausentes, o se les puede utilizar como moldes para la reparación o sustitución de estructuras de cabeza y cuello. El material, en cualquiera de sus múltiples formas sólidas o fluidificadas, se puede usar como soporte para la reparación dérmica o epidérmica, inyectado en diversos esfínteres del cuerpo tales como el esfínter urinario o el esfínter esofágico o gástrico, plegado en un tubo o un tubo parcial en forma de conducto para la restauración de tejido nervioso, o extrusionado o moldeado en cualquier forma apropiada para su aplicación como composición regenerativa de tejido. La composición regenerativa de tejido de la invención se puede fijar mediante suturas en su forma de lámina sólida, se puede aplicar sobre heridas o zonas del cuerpo en forma de gel, o se puede inyectar en forma de líquido o en forma particulada. Las composiciones tisulares de la presente invención inducen el crecimiento de tejidos endógenos, incluidos los tejidos epitelial y conectivo, cuando los tejidos diana se colocan, *in vivo*, en contacto con composiciones desvitalizadas de tejidos, derivados de mamíferos, que comprenden al menos una porción de una membrana basal epitelial.

Matriz de la vejiga (UBM)

Las composiciones de UBM comprenden al menos colágeno de tipo I y tipo IV, glicosaminoglicanos, incluido ácido hialurónico, sulfatos de condroitina A y B, heparina y sulfato de heparina. Adicionalmente, en la UBM se encuentran presentes uno o múltiples factores básicos de crecimiento de fibroblastos, factores de crecimiento celular del endotelio vascular, y TGF-beta.

Las propiedades físicas de UBM se han caracterizado parcialmente. UBM posee una resistencia uniaxial de aproximadamente 45-907 g (0,1-2,0 libras) por banda de 1 cm de ancho (medida con una máquina de sistema de ensayo de materiales a través de los Estándares Norteamericanos de Ensayo de Materiales, con una extensión de 2,54 cm/minuto, que es 1 pulgada/minuto). La fuerza de retención de la sutura del material es de aproximadamente 1,0-4,0 Newtons (N) por capa de lámina, específicamente 4-18 N para una matriz de 4 capas, y 30N - 120 N para una matriz de 30 capas. La fuerza de fracaso en el ensayo de rotura de bola es de aproximadamente 1,8-4,5 kg (4-10 libras) para cada capa, específicamente 32-80 N para 8 capas, 16-40 N para 4 capas, y 36-120 N para 12 capas.

El índice de porosidad se define como la cantidad de agua que fluye a través de un material por cm²/minuto a una presión de 120 mmHg. La porosidad al agua difiere de una cara a otra de la UBM, dependiendo de la dirección de flujo. El agua fluye desde la membrana basal epitelial hacia la cara abluminal a aproximadamente 20% de la velocidad de flujo del agua desde la cara abluminal hacia la cara de la membrana basal epitelial de la matriz. La UBM tiene también propiedades viscoelásticas.

La UBM se puede esterilizar por cualquiera de una serie de métodos convencionales, sin perder su capacidad para inducir el crecimiento de tejido endógeno. Por ejemplo, después de enjuagar el material en solución salina y ácido peracético a 0,05% hasta 1,0%, se puede esterilizar por tratamiento con óxido de etileno, tratamiento con radiación gamma (0,5 a 2,5 mRad), esterilización por plasma gaseoso, o tratamiento con rayo e. Igualmente, el material se puede esterilizar por tratamiento con glutaraldehído, que produce reticulación del material proteico, pero este tratamiento altera el material de forma sustancial, de manera que su resorción es lenta o nula, y determina un tipo diferente de remodelamiento del hospedador que se asemeja más a la formación de tejido de cicatrización o encapsulación que al remodelamiento constructivo. También se puede inducir la reticulación del material proteico con carbodiimida o métodos de deshidratación térmica o foto-oxidación.

Los ejemplos siguientes sirven para demostrar con mayor exactitud la eficacia de la presente invención.

40 Ejemplificación

Como ejemplo de la utilidad de los métodos y composiciones de la invención, se aplica la UBM en defectos de válvulas cardiacas. Tal como podrán apreciar los expertos en la técnica, los métodos y composiciones descritos en este documento son aplicables a otras composiciones regenerativas de tejido derivadas de fuentes de tejido epitelial distintas de la vejiga, de fuentes de mamíferos diferentes del cerdo, y a defectos tisulares diferentes de las válvulas cardiacas. Adicionalmente, la composición regenerativa del tejido según la invención que puede aplicar en una forma distinta de una lámina o una lámina multicapa de material, por ejemplo, la UBM se puede aplicar en forma de extracto, gel, polvo, tubo, lámina, o en forma de bandas, cuerdas, o riostras, o mezclada con otros productos farmacéuticos, por ejemplo, factores de crecimiento y productos génicos. La UBM se puede extruir o moldear en un molde para adaptarla a una aplicación particular en el cuerpo. La preparación de forma fluidificadas de tejido se describe en la Patente de EE.UU. N° 5.275.826, y la preparación de láminas sólidas y bandas de tejido se describe en la Patente de EE.UU. N° 5.711.969.

Aplicación 1: Reparación de tejido cardiaco

Una realización, según la invención, es una composición regenerativa de tejido para la reparación o sustitución de tejidos cardiacos. Tejidos cardiacos incluyen, sin limitaciones, tejido cardiaco enfermo, dañado o ausente que comprende el miocardio, epicardio, endocardio, pericardio, tabiques inter-auricular e inter-ventricular, y todas las válvulas cardiacas y valvas valvulares asociadas, incluida la válvula pulmonar, válvula aórtica, válvula aurículo-ventricular derecha y válvula aurículo-ventricular izquierda, y porciones de vasos adyacentes del corazón, incluidas la arteria pulmonar, vena pulmonar, aorta, vena cava inferior, y vena cava superior.

En esta realización de la invención que se describe en este documento, la UBM se preparó a partir de vejiga porcina como se ha descrito anteriormente, y se utilizó como valva de sustitución autogénica y xenogénica de la válvula cardiaca anterior de la válvula pulmonar en cinco cerdos y tres perros.

5 La UBM, configurada como una lámina simple de material o como material de doble espesor, se cortó con tijeras o un escalpelo en el momento de la intervención quirúrgica para adaptarla a la valva anterior de la válvula pulmonar. La UBM se adhirió mediante sutura directamente al anillo en la base de la válvula. En la realización de lámina simple, la cara de membrana basal epitelial de la UBM se dispuso sobre el lado luminal ventricular derecho de la valva de sustitución valvular, y se suturó directamente al anillo de la válvula pulmonar. En la realización de lámina de
10 doble espesor de la UBM, la UBM se plegó de manera que la membrana basal epitelial se dispuso sobre ambas superficies, es decir, las superficies ventricular y arterial de la valva de sustitución de la válvula pulmonar, y se suturó directamente al anillo de la válvula pulmonar.

Las válvulas pulmonares de los perros y cerdos experimentales se examinaron 6 y 12 semanas después de la sustitución valvular. Un perro fue examinado a los 5 meses después de la sustitución de la valva valvular. Se utilizaron técnicas convencionales de fijación de tejidos e histopatológicas para examinar las valvas valvulares
15 recogidas.

A las 6 semanas después de la sustitución de la valva valvular, se observó epitelización de la valva de sustitución valvular sobre toda la superficie de la valva valvular. Las células migratorias sobre la superficie de la valva valvular mostraron reacción positiva a la tinción inmunofluorescente del factor de von Willebrand, lo que indica que estas células son de origen endotelial. En algunas valvas valvulares, algunas de las células endoteliales exhibieron
20 propiedades de células madre precoces. Se observaron neovascularización, infiltración de células endoteliales, y depósito de matriz extracelular con origen en el tejido hospedador presente en el anillo de la válvula pulmonar, que se extendió hacia la valva de sustitución valvular.

A las 12 semanas y a los 5 meses después de la sustitución de la valva valvular, no fue posible reconocer ya ninguno de los componentes tisulares originales de la UBM, siendo completa la restauración de la valva valvular. Hallazgos inesperados en cualquiera de los momentos de observación incluyeron ausencia de invasión endotelial en
25 la valva de sustitución valvular, ausencia de trombosis, y ausencia de calcificación o de rechazo mediado celularmente de la valva de sustitución valvular. Además, la forma de la valva de sustitución valvular permaneció inalterada con respecto a la forma de la valva valvular original durante toda la observación.

Estudios ecográficos de la válvula pulmonar en cerdos a las 8, 12, 16 y 20 semanas después de la sustitución de la
30 válvula demostraron que ésta era competente.

En otra realización de este aspecto de la invención, se aplican o inyectan formas fluidificadas, pulverizadas o pulverulentas de UBM en o en las zonas adyacentes a tejido cardiaco enfermo o defectuoso para estimular la reparación de tejido endógeno. Por ejemplo, se inyecta UBM fluidificada en o en la zona adyacente a un defecto
35 congénito del tabique inter-ventricular, un defecto congénito del tabique inter-auricular, o en la luz de un conducto arterioso permeable para estimular el crecimiento endógeno de tejido en estas zonas.

La aplicación de UBM en los tejidos cardiacos se lleva a cabo utilizando varios métodos quirúrgicos diferentes. Por ejemplo, se utiliza un procedimiento mínimamente invasivo para acceder al sitio de cirugía cardiaca con la ayuda de un laparoscopio. De manera alternativa, se realiza una toracotomía. La UBM se lleva al sitio quirúrgico en cualquiera
40 de sus formas tales como lámina, asa, banda o en forma de inyectable, polvo o forma pulverizada. Las láminas o bandas de UBM se adaptan específicamente a su aplicación cardiaca antes o durante el procedimiento quirúrgico. Las láminas o bandas de UBM se fijan de manera adyacente o en el propio tejido cardiaco defectuoso o enfermo mediante suturas, grapas, adhesivo tisular o cualquier otro medio conocido por los expertos en la técnica.

Aplicación 2: Matriz para la proliferación celular *in vitro*

Las células endoteliales microvasculares humanas (HMVEC, en sus siglas en inglés) forman el endotelio, una capa simple de células organizada sobre una membrana basal *in vivo*, de una forma semejante al epitelio. Se han llevado a cabo estudios *in vitro* utilizando HMVEC dispuestas sobre (i) la cara de membrana basal epitelial de una lámina de UBM, (ii) la superficie abluminal de UBM, (iii) composición submucosa para el injerto de tejidos (SIS), preparada de acuerdo con los métodos descritos en las patentes '508 y '178, y (iv) la composición tisular de submucosa vesical (UBS), preparada según el método descrito en la patente '389.
45

Las HMVEC crecieron hacia el interior de la matriz y no formaron una capa de células confluentes, después de 3 días de crecimiento, cuando se dispusieron sobre la superficie de SIS y UBS, independientemente de si las HMVEC se depositaron sobre la superficie luminal o abluminal de SIS o UBS.
50

Las HMVEC dispuestas sobre la superficie abluminal de UBM crecieron hacia el interior de la matriz, proliferaron y se diferenciaron en células endoteliales maduras. Al igual que las HMVEC dispuestas sobre la superficie abluminal de SIS y UBS, tampoco se formó una capa confluyente de HMVEC sobre la superficie abluminal de UBM después de
55 3 días de crecimiento.

A diferencia de otras composiciones regenerativas de tejido anteriormente conocidas, tales como SIS y UBS, en estos estudios las HMVEC dispuestas sobre la cara de membrana basal epitelial (luminal) de una lámina de UBM, fijada a UBM, proliferaron, se diferenciaron y formaron una monocapa confluyente después de 3 días de crecimiento.

Aplicación 3:

- 5 Se contempla el posible uso de la composición para injerto de tejido de la presente invención para inducir la reparación o sustitución de tejido *in vivo* tales como ligamentos, tendones, cartílago, hueso, articulaciones, y músculo, tejidos epiteliales tales como vejiga y otros tejidos de las vías urogenitales, estómago, esófago y otros tejidos del tracto gastrointestinal, hígado, tejido nervioso, tejidos de cabeza y cuello, piel y otros tejidos, utilizando los mismos procedimientos descritos en las Patentes de EE.UU. N^{os} 4.902.508; 4.956.178; 5.281.422; 5.352.463; 5.554.389; 5.275.826; 4.902.508; 5.372.821; 5.445.833; 5.516.533; 5.573.784; 5.641.518; 5.695.998; 5.711.969; 10 5.755.791; 5.762.966; y 5.885.619. La composición para injerto de tejidos según la invención se puede utilizar también con polímeros sintéticos o no sintéticos para la restauración de tejidos.

REIVINDICACIONES

1. Una composición desvitalizada regenerativa de tejido, que comprende
membrana basal epitelial intacta, y al menos la porción subyacente de la túnica propia recolectada de un tejido epitelial de mamífero, por lo que dicha composición desvitalizada regenerativa del tejido restaura o sustituye tejido de un paciente.
- 5
2. La composición de la reivindicación 1, en la que dicha membrana basal epitelial es:
- a) completa, intacta; y/o
- b) derivada de la vejiga y localizada en una superficie luminal de dicha composición regenerativa de tejido y una matriz extracelular colágena, densa, parcialmente organizada en la cara abluminal; o
- 10 c) derivada de la vejiga y plegada de manera que la membrana basal epitelial se disponga sobre ambas superficies de dicha composición regenerativa de tejido.
3. La composición de la reivindicación 1, en la que dicha composición se deriva del intestino delgado.
4. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho tejido epitelial comprende vejiga, o intestino delgado, o intestino.
- 15 5. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho tejido epitelial de mamífero está en forma de lámina.
6. La composición de la reivindicación 1, en la que dicha composición comprende:
- una forma particulada;
- una forma de gel;
- una forma deshidratada;
- 20 una forma hidratada congelada;
- una forma liofilizada;
- una forma extruida o moldeada;
- una forma de lámina;
- una forma líquida; o
- 25 una forma tubular de la vejiga.
7. La composición desvitalizada regenerativa del tejido de la reivindicación 1 para usar en la restauración o sustitución de un tejido de un paciente,
- a) en la que dicha membrana basal epitelial, y dicha porción subyacente de la túnica propia están desprovistas de las células epiteliales lumbinales, las capas adventicia abluminal, serosa y de músculo liso, y de las capas submucosas; o
- 30 b) que comprende además células musculares lisas de la túnica muscular, en donde la membrana basal epitelial, la túnica propia y las células musculares lisas de la túnica muscular están deslaminadas de células epiteliales de un epitelio de mamífero; o
- c) que comprende además submucosa, en donde la membrana basal epitelial, la túnica propia, y la túnica submucosa están deslaminadas de células epiteliales, túnica muscular y túnica serosa; o
- 35 d) que comprende además túnica submucosa, y al menos una porción de túnica muscular, en donde la túnica propia es adyacente a la membrana basal epitelial.

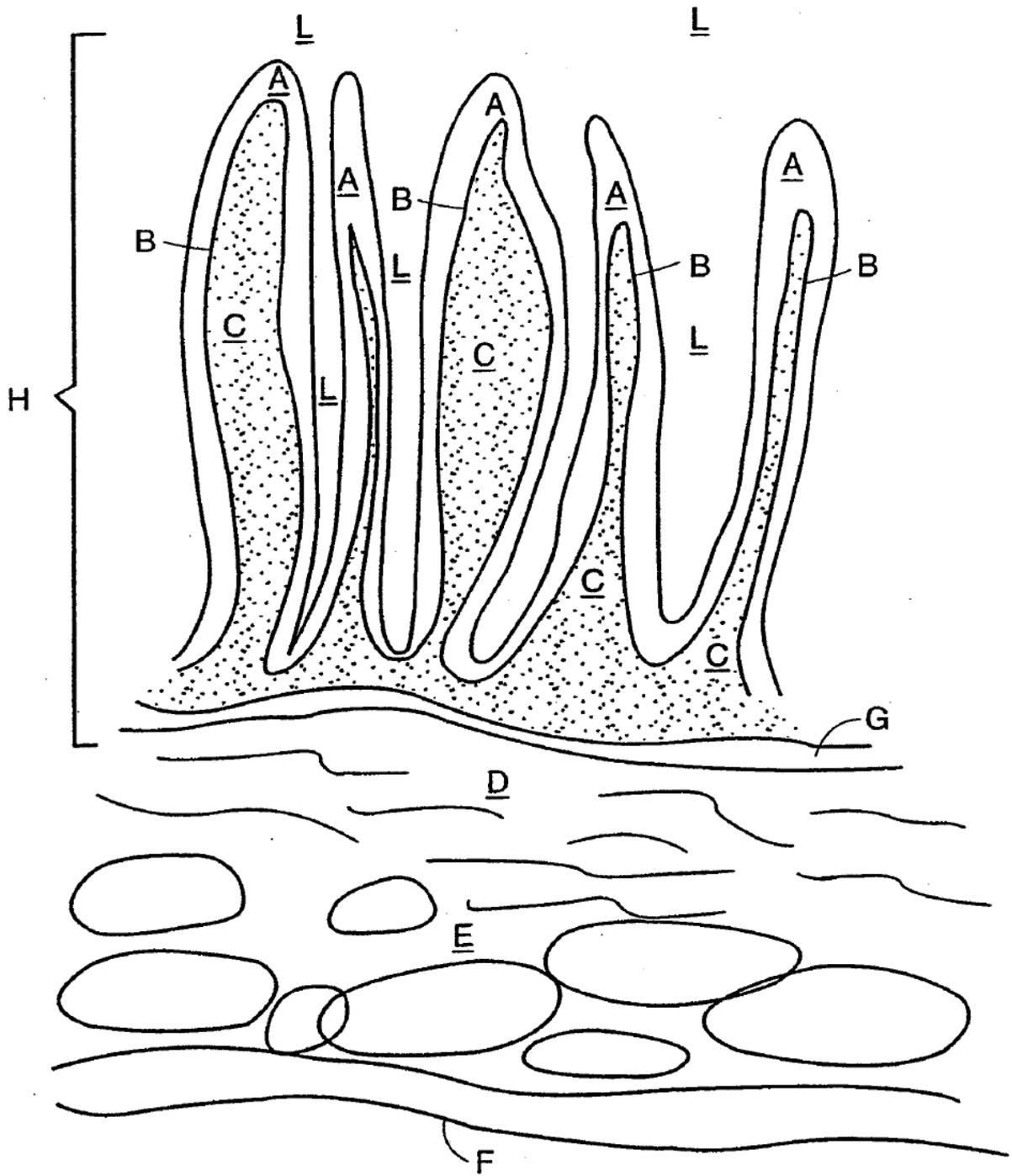


FIG. 1A

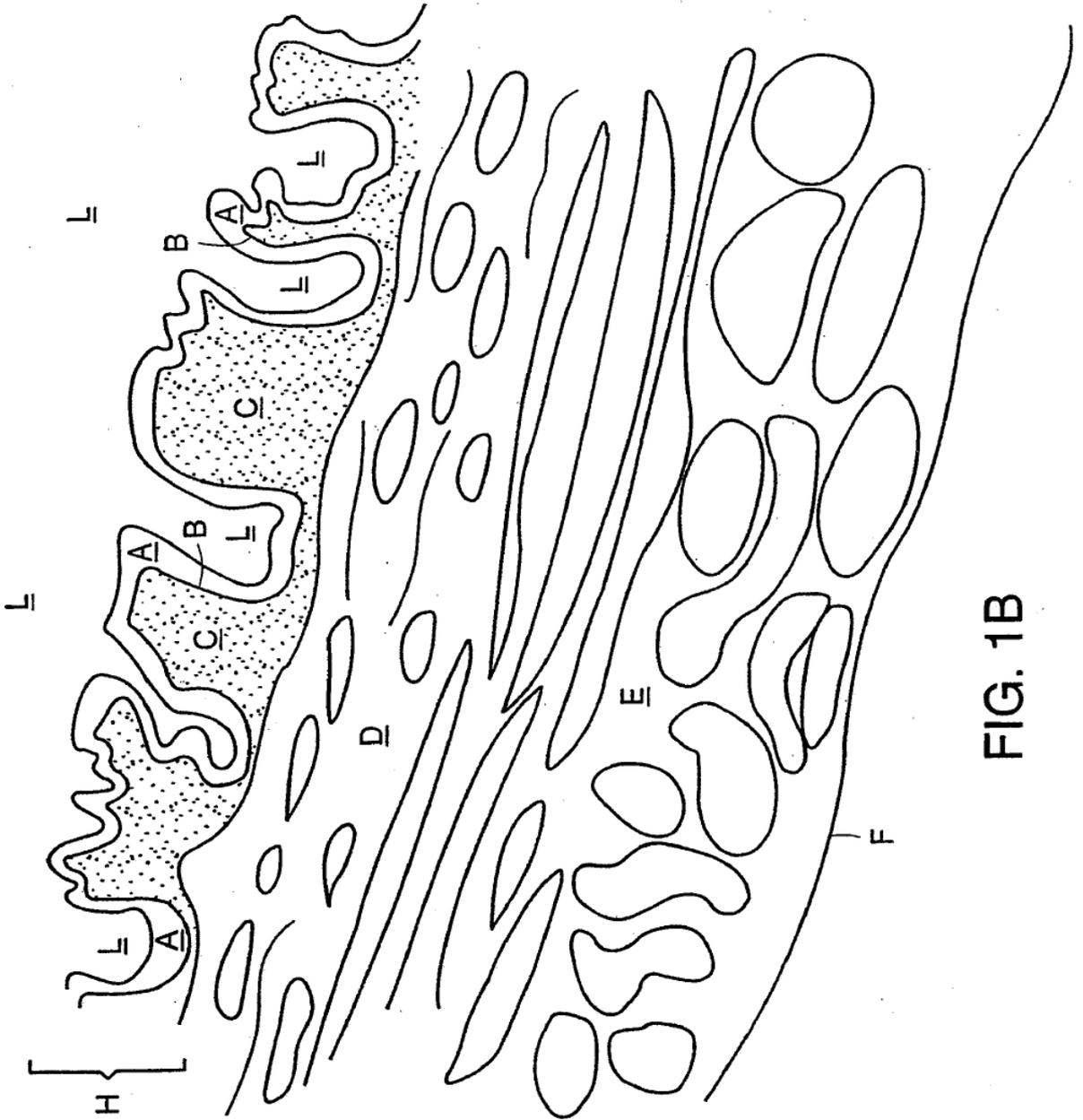


FIG. 1B