

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 762 118**

51 Int. Cl.:

A61L 27/48 (2006.01)

A61L 27/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.08.2011 E 17210125 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2019 EP 3323438**

54 Título: **Andamiajes tisulares regenerativos**

30 Prioridad:

10.08.2010 US 372339 P

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

22.05.2020

73 Titular/es:

**LIFECCELL CORPORATION (100.0%)
5 Giralda Farms
Madison, New Jersey 07940, US**

72 Inventor/es:

**OWENS, RICK T.;
ELMO, LAURA;
LIU, MIKE y
MAO, YONG**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 762 118 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

Andamiajes tisulares regenerativos

5 La presente divulgación se refiere a kits para tratar defectos o lesiones tisulares u orgánicas, incluyendo kits para producir andamiajes tisulares para tratar defectos tisulares.

10 Actualmente se están usando materiales humanos, animales y sintéticos en procedimientos médicos y quirúrgicos para aumentar el tejido o corregir defectos tisulares. Para determinados propósitos, se necesitan materiales con formas estables. En algunos casos, la manera de suministrar dicho material, por ejemplo, mediante un procedimiento quirúrgico o por inyección, puede ser importante. Adicionalmente, puede necesitarse la capacidad del material de que no migre desde la ubicación que necesita tratamiento.

15 Diversos dispositivos y procedimientos actuales para tratar defectos tisulares u orgánicos han tenido determinadas desventajas. Por consiguiente, hay una necesidad de dispositivos y procedimientos mejorados para tratar los defectos tisulares u orgánicos.

20 LEE S J et al., "In vitro evaluation of a poly(lactide-co-glycolide)-collagen composite scaffold for bone regeneration", BIOMATERIALS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV., BARKING, GB, vol. 27, n.º 18, 1 de junio de 2006 (01-06-2006), páginas 3466-3472, XP025097218, ISSN: 0142-9612, DOI: 10.101 6/J.BIOMATERIALS.2006.01.059 9 divulga un procedimiento para la preparación de un andamiaje de material compuesto, que comprende las etapas de:

25 - Mezclar un polvo de matriz descelularizada de la submucosa de la vejiga y partículas porógenas en un PLGA disuelto en cloruro de metileno
 - Secar el material compuesto para eliminar el disolvente residual
 - Sumergir el material compuesto en agua desionizada para disolver la sal incrustada, obteniendo de este modo el andamiaje.

30 El alcance de la invención se define por las reivindicaciones. Cualquier referencia a la descripción a procedimientos de tratamiento se refiere a los productos de la presente invención para su uso en un procedimiento para el tratamiento.

35 La presente invención se refiere a proporcionar un kit que comprende: una matriz tisular acelular (ATM) en partículas;
 un disolvente miscible en agua; y
 un polímero que se puede disolver en el disolvente
 en el que después de mezclar la ATM, el polímero y el disolvente y colocar la mezcla en contacto con un medio acuoso, el disolvente miscible en agua puede difundirse a partir de la mezcla para permitir que la mezcla forme un
 40 andamiaje tisular a partir del polímero y la ATM.

Breve descripción de los dibujos

45 La figura 1 es un diagrama de flujo que muestra un procedimiento para preparar un andamiaje tisular.
 La figura 2 ilustra el implante de un andamiaje tisular en un defecto, de acuerdo con determinadas realizaciones.
 La figura 3A es un explante subdérmico de cuatro semanas teñido con hematoxilina y eosina que comprende PCL en aumento 400 x, como se describe en el ejemplo 1.
 La figura 3B es un explante subdérmico de cuatro semanas teñido con hematoxilina y eosina de un andamiaje tisular inyectable que comprende PCL, pADM y dioxano en aumento 400 x de acuerdo con un procedimiento
 50 descrito en el ejemplo 1.
 La figura 3C es un explante subdérmico de cuatro semanas teñido con hematoxilina y eosina de un andamiaje tisular inyectable que comprende PCL, pADM y NMP en aumento 400 x de acuerdo con un procedimiento descrito en el ejemplo 1.
 La figura 3D es un explante subdérmico de cuatro semanas teñido con hematoxilina y eosina que comprende
 55 P4HB en aumento 400 x, como se describe en el ejemplo 1.
 La figura 3E es un explante subdérmico de cuatro semanas teñido con hematoxilina y eosina de un andamiaje tisular inyectable que comprende P4HB, pADM y dioxano en aumento 400 x de acuerdo con un procedimiento descrito en el ejemplo 1.
 La figura 3F es un explante subdérmico de cuatro semanas teñido con hematoxilina y eosina de un andamiaje
 60 tisular inyectable que comprende P4HB, pADM y NMP en aumento 400 x de acuerdo con un procedimiento descrito en el ejemplo 1.
 La figura 4A es un explante subdérmico de doce semanas teñido con hematoxilina y eosina que comprende PCL en aumento 400 x, como se describe en el ejemplo 1.
 La figura 4B es un explante subdérmico de doce semanas teñido con hematoxilina y eosina de un andamiaje
 65 tisular inyectable que comprende PCL, pADM y dioxano en aumento 400 x de acuerdo con un procedimiento descrito en el ejemplo 1.

La figura 4C es un explante subdérmico de doce semanas teñido con hematoxilina y eosina de un andamiaje tisular inyectable que comprende PCL, pADM y NMP en aumento 400 X de acuerdo con un procedimiento descrito en el ejemplo 1.

5 La figura 4D es un explante subdérmico de doce semanas teñido con hematoxilina y eosina de un andamiaje tisular inyectable que comprende P4HB en aumento 400 x, como se describe en el ejemplo 1.

La figura 4E es un explante subdérmico de doce semanas teñido con hematoxilina y eosina de un andamiaje tisular inyectable que comprende P4HB, pADM y dioxano en aumento 400 x de acuerdo con un procedimiento descrito en el ejemplo 1.

10 La figura 4F es un explante subdérmico de doce semanas teñido con hematoxilina y eosina de un andamiaje tisular inyectable que comprende P4HB, pADM y NMP en aumento 400 x de acuerdo con un procedimiento descrito en el ejemplo 1.

La figura 5A es un explante de cóndilo femoral de cuatro semanas teñido con hematoxilina y eosina de un andamiaje tisular inyectable que comprende BHA, pADM y NMP en aumento 20 x de acuerdo con un procedimiento descrito en el ejemplo 2.

15 La figura 5B es un explante de cóndilo femoral de cuatro semanas teñido con hematoxilina y eosina de un andamiaje tisular inyectable que comprende BHA, pADM y NMP en aumento 100 x de acuerdo con un procedimiento descrito en el ejemplo 2.

20 La figura 5C es un explante de cóndilo femoral de cuatro semanas teñido con hematoxilina y eosina de un andamiaje tisular inyectable que comprende BHA, pADM y NMP en aumento 400 x de acuerdo con un procedimiento descrito en el ejemplo 2.

La figura 6 es una imagen de un cóndilo femoral doce semanas después de implantar un andamiaje tisular inyectable que comprende BHA, pADM y NMP en un defecto tisular.

25 Descripción de realizaciones ejemplares

En la presente solicitud, el uso del singular incluye el plural salvo que se indique específicamente de otro modo. En esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o" salvo que se indique de otro modo. Además, el uso del término "incluyendo", así como otras formas, tales como "incluye" e "incluido" no es limitante.

30 Los encabezados de sección usado en el presente documento son con fines organizativos únicamente y no deben interpretarse como limitantes de la materia objeto descrita.

Se entenderá que los beneficios y ventajas descritos en el presente documento pueden referirse a una realización o pueden referirse a varias realizaciones. Se entenderá además que referencias a "un" artículo se refiere a uno o más de esos artículos.

35 Las etapas de los procedimientos descritos en el presente documento pueden realizarse en cualquier orden adecuado, o simultáneamente cuando sea apropiado.

40 La expresión "matriz tisular acelular" (ATM), como se usa en el presente documento, se refiere en general a cualquier matriz tisular que esté sustancialmente libre de células y/o componentes celulares. La piel, partes de la piel (por ejemplo, dermis) y otros tejidos, tales como vasos sanguíneos, válvulas cardíacas, fascia, cartílago, hueso, nervio y tejidos conjuntivos pueden usarse para crear matrices acelulares dentro del ámbito de la presente divulgación (por ejemplo, mediante la eliminación de las células y/o componentes celulares). Las matrices tisulares
45 acelulares pueden ensayarse o evaluarse para determinar si están sustancialmente libres de células y/o componentes celulares de varias maneras. Por ejemplo, pueden inspeccionarse tejidos procesados con microscopía óptica para determinar si permanecen células (vivas o muertas) y/o componentes celulares. Además, pueden usarse determinados ensayos para identificar la presencia de células o componentes celulares. Por ejemplo, pueden usarse ensayos de ADN u otros ácidos nucleicos para cuantificar los materiales nucleares restantes dentro de las matrices
50 tisulares. En general, la ausencia de ADN u otros ácidos nucleicos restantes será indicativa de descelerización completa (es decir, eliminación de células y/o componentes celulares). Finalmente, pueden usarse otros ensayos que identifican componentes específicos celulares (por ejemplo, antígenos superficiales) para determinar si las matrices tisulares son acelulares.

55 Los andamiajes tisulares que se pueden obtener a partir de los kits de la presente divulgación pueden incluir una ATM que tiene la capacidad biológica de sustentar la regeneración tisular. En algunas realizaciones, los andamiajes tisulares pueden sustentar el crecimiento interno y diferenciación celular. Por ejemplo, los andamiajes pueden usarse para el crecimiento interno tisular, cirugía ortopédica, aplicaciones periodontales, remodelado tisular o restauración tisular. En una realización, los andamiajes tisulares producen una respuesta tisular regenerativa, como se demuestra por la presencia de células de tipo fibroblasto y vasos sanguíneos.

60 En diversas realizaciones, los andamiajes tisulares obtenibles de los kits pueden usarse para el tratamiento de numerosos sitios anatómicos diferentes y pueden usarse en una amplia gama de aplicaciones. Determinadas aplicaciones ejemplares incluyen, aunque sin limitación, vendajes absorbentes, regeneración dérmica (por ejemplo, para tratamientos de todos los tipos de úlceras y quemaduras), regeneración nerviosa, regeneración de cartílago, regeneración o reparación de tejido conjuntivo, regeneración ósea, revestimiento de heridas/con espuma, vendajes

con venda integrada, sustrato/base para injertos de piel, regeneración vascular, cirugía cosmética, recubrimiento de implantes metálicos y/o poliméricos (por ejemplo, para aumentar la integración y biocompatibilidad del implante) y remplazo de tejido perdido (por ejemplo, después de un traumatismo, reducción de pecho, mastectomía, lumpectomía, parotidectomía o escisión de tumores).

Los andamiajes tisulares obtenibles de los kits pueden provocar una respuesta inmunológica o inflamatoria reducida cuando se implantan en un animal en comparación con el polímero o polímeros usados para producir el andamiaje en solitario. El efecto del andamiaje tisular en el hospedador puede ensayarse usando varios procedimientos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el efecto del andamiaje tisular en el hospedador puede ensayarse midiendo la respuesta inmunológica o inflamatoria al andamiaje implantado. La respuesta inmunológica o inflamatoria al andamiaje tisular puede medirse por varios procedimientos, incluyendo procedimientos histológicos. Por ejemplo, el andamiaje explantado puede teñirse y observarse al microscopio para evaluación histológica, como se describe adicionalmente a continuación. En algunas realizaciones, la respuesta inmunológica o inflamatoria al andamiaje puede demostrarse midiendo el número de células inflamatorias (por ejemplo, leucocitos). La respuesta inmunológica o inflamatoria atenuada al andamiaje puede asociarse con un número reducido de células inflamatorias, como se describe adicionalmente a continuación. Por ejemplo, pueden medirse las células inflamatorias a través de procedimientos de tinción inmunohistoquímica diseñados para identificar linfocitos, macrófagos y neutrófilos. Los procedimientos inmunohistoquímicos también pueden usarse para determinar la presencia de citocinas inflamatorias incluyendo interleucina-1, TNF-alfa y TGF-beta.

En diversas realizaciones, los andamiajes tisulares obtenibles de los kits de la presente divulgación pueden usarse para tratar cualquiera de una amplia gama de trastornos. Los defectos tisulares pueden surgir por muchas causas incluyendo, por ejemplo, malformaciones congénitas, lesiones traumáticas, infecciones y resecciones oncológicas. Los andamiajes tisulares pueden usarse para tratar defectos musculoesqueléticos, por ejemplo, como un injerto articular para sustentar la regeneración del cartílago. Los andamiajes tisulares también pueden usarse para tratar defectos en cualquier tejido blando, por ejemplo, tejidos que conectan, sustentan o rodean otras estructuras y órganos del organismo. El tejido blando puede ser cualquier tejido no óseo.

Los andamiajes tisulares obtenibles de los kits pueden usarse para tratar tejidos blandos en muchos sistemas orgánicos diferentes. Estos sistemas orgánicos pueden incluir, aunque sin limitación, el sistema muscular, el sistema genitourinario, el sistema gastroenterológico, el sistema integumentario, el sistema circulatorio y el sistema respiratorio. Los andamiajes tisulares también pueden ser útiles para tratar el tejido conjuntivo, incluyendo la fascia, una capa especializada que rodea los músculos, los huesos y las articulaciones de la pared torácica y abdominal, y para reparar y reforzar la debilidad tisular en la anatomía urológica, ginecológica y gastroenterológica. En algunas realizaciones, el tejido u órgano que necesita tratamiento puede seleccionarse del grupo que consiste en piel, hueso, cartílago, menisco, dermis, miocardio, perostio, arteria, vena, estómago, intestino delgado, intestino grueso, diafragma, tendón, ligamento, tejido neural, músculo estriado, músculo liso, vejiga, uretra, uréter y encía.

La fig. 1 ilustra las etapas para preparar un andamiaje tisular obtenible del kit. Los andamiajes pueden incluir una ATM en partículas (etapa 100). En algunas realizaciones, la ATM puede obtenerse de, por ejemplo, dermis, cartílago, hueso, hueso desmineralizado, vasos sanguíneos, válvulas cardíacas, fascia o tejido conjuntivo nervioso. La preparación de ATM en partículas se describe en mayor detalle a continuación. En algunas realizaciones, la ATM en partículas comprende partículas de tamaño uniforme. La ATM en partículas puede comprender una ATM dérmica. En algunas realizaciones, la ATM dérmica es una matriz tisular humana. En algunas realizaciones, la ATM dérmica es una matriz tisular porcina. En algunas realizaciones, la ATM en partículas es una matriz tisular de cartílago, que puede obtenerse de cartílago humano. En algunas realizaciones, la matriz tisular de cartílago se obtiene de cartílago porcino. En algunas realizaciones, la ATM en partículas comprende una matriz tisular de hueso. En algunas realizaciones, la matriz tisular de hueso se obtiene de hueso humano. En algunas realizaciones, la matriz tisular de hueso se obtiene de hueso porcino.

La ATM puede seleccionarse para proporcionar una diversidad de diferentes propiedades biológicas y mecánicas. Por ejemplo, la ATM puede seleccionarse para permitir el crecimiento interno celular y el remodelado para permitir la regeneración de tejido normalmente encontrado en el sitio donde se implanta la matriz. Por ejemplo, la ATM, cuando se implanta sobre o en cartílago, puede seleccionarse para permitir la regeneración del cartílago sin fibrosis o formación de cicatriz excesiva. Además, la ATM puede seleccionarse para limitar la reacción inflamatoria excesiva y para producir tejido similar al tejido original del hospedador. En algunas realizaciones, la ATM comprende colágeno, elastina y canales vasculares. Se analizan ejemplos de ATM adicionalmente a continuación.

Además, los andamiajes tisulares obtenibles de los kits incluyen uno o más materiales poliméricos que se pueden disolver en el disolvente, y que pueden seleccionarse de varios tipos de polímero. Como se usa en el presente documento, los materiales poliméricos pueden incluir polímeros sintéticos y/o polímeros de origen natural. Además, los materiales poliméricos pueden incluir polímeros individuales y/o mezclas de polímeros (copolímeros). En algunas realizaciones, los materiales poliméricos pueden incluir poliglicolato, polilactida, polidioxano (u otros ésteres de poliéter), poli(lactida-co-glicólido) y/o polihidroxialconoatos. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el material puede incluir polihidroxialconoatos tales como, por ejemplo, polihidroxibutirato (por ejemplo, poli-3-hidroxibutirato, poli-4-hidroxibutirato (P4HB)), polihidroxi valerato, polihidroxihexanoato, polihidroxi octanoato o carbonato de trimetileno. Como alternativa o adicionalmente, el material polimérico puede incluir policaprolactona (PCL) y/o

derivados de ácido hialurónico (por ejemplo, ésteres, anhídridos, etc.), tales como, por ejemplo, un derivado de éster bencílico de ácido hialurónico (BHA). En determinadas realizaciones, los materiales poliméricos en los andamiajes tisulares pueden proporcionar una estructura para la ATM. La estructura puede aumentar la integración, la biocompatibilidad y la estabilidad del implante y puede evitar la migración del implante desde el sitio de tratamiento. Además, la inclusión de la ATM con el polímero en los andamiajes tisulares puede aumentar la aceptación del polímero mediante atenuación o reducción de la respuesta inmunológica o inflamatoria, en comparación con un implante que comprende únicamente el polímero.

En algunas realizaciones, el polímero puede disolverse en un disolvente adecuado (etapa 120) para formar una solución de polímero. Como se usa en el presente documento, el disolvente puede incluir mezclas de disolventes. En determinadas realizaciones, el disolvente puede elegirse basándose en el polímero que se usa y/o el entorno en que se mezclará o del que se suministrará para que sea apropiadamente reactivo para evitar reacciones indeseadas. El disolvente seleccionado también puede ser débilmente volátil. En algunas realizaciones, el disolvente puede incluir, por ejemplo, dioxano, N-metil-2-pirrolidona (NMP) y/o dimetilsulfóxido (DMSO). Disolver el polímero en el disolvente puede proporcionar una solución de viscosidad apropiada para acomodar exhaustivamente la mezcla con la ATM en partículas y facilitar en implante de la combinación (por ejemplo, por inyección, compactación en un sitio, etc.). La concentración de polímero puede manipularse para crear una mezcla más o menos viscosa.

Como un ejemplo, en algunas realizaciones, puede disolverse PCL en dioxano y/o NMP. En determinadas realizaciones, la PCL disuelta en dioxano y/o NMP puede ser aproximadamente un 5-30 % (p/v). En una realización adicional, la PCL disuelta en dioxano y/o disolvente NMP puede ser de un 5 %, 8 %, 10 %, 12 %, 15 %, 18 %, 20 %, 25 % o un 30 % (p/v); de un 5 % a un 30 % (p/v); o de un 10 % a un 20 % (p/v) y cualquier valor entre medias.

En otras realizaciones, puede disolverse P4HB en dioxano y/o NMP. En algunas realizaciones, el P4HB disuelto en dioxano y/o NMP puede ser aproximadamente un 5-40 % (p/v). En una realización adicional, el P4HB disuelto en dioxano y/o NMP puede ser de un 5 %, 8 %, 10 %, 12 %, 15 %, 18 %, 20 %, 25 %, 30 % o un 40 % (p/v); de un 5 % a un 40 % (p/v); o de un 10 % a un 30 % (p/v) y cualquier valor entre medias.

En otras realizaciones, puede disolverse BHA en DMSO y/o NMP. En algunas realizaciones, el BHA disuelto en DMSO y/o NMP puede ser aproximadamente un 5-50 % (p/v). En una realización adicional, el BHA disuelto en in DMSO y/o NMP puede ser de un 5 %, 8 %, 10 %, 12 %, 15 %, 18 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 % o 50 % (p/v); de un 5 % a un 50 % (p/v); de un 5 % a un 40 % (p/v); de un 10 % a un 40 % (p/v); o de un 10 % a un 30 % (p/v) y cualquier valor entre medias.

Cada uno de estos materiales de andamiaje puede conferir diferentes propiedades al producto final permitiendo la manipulación de la renovación/persistencia *in vivo*, propiedades biomecánicas y respuesta biológica global.

La solución de polímero entonces puede mezclarse con la ATM en partículas (etapa 130). En algunas realizaciones, el volumen de solución de polímero puede seleccionarse para proporcionar una concentración final de un 25 % (p/p) de polímero global cuando se combina con la ATM en partículas. El procedimiento para mezclar la solución con la ATM en partículas puede seleccionarse basándose en la ubicación pretendida para formar el andamiaje tisular. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la solución puede mezclarse con la ATM en partículas en cualquier receptáculo adecuado. En otras realizaciones, la solución y la ATM en partículas pueden mezclarse en una o más jeringas. Por ejemplo, la ATM en partículas puede colocarse en una primera jeringa. Un volumen deseado de solución de polímero puede extraerse en una segunda jeringa. La primera y la segunda jeringa entonces pueden acoplarse y los materiales en cada una pueden mezclarse pasando los materiales entre las jeringas. La mezcla final resultante entonces puede transferirse a una única jeringa. Entonces puede adherirse una aguja o cánula a la jeringa para facilitar la inyección de la mezcla.

En una realización, algunos o todos los componentes de la mezcla de andamiaje tisular pueden premezclarse o preenvasarse conjuntamente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un polímero que ya está disuelto en un disolvente a una concentración deseada puede proporcionarse para preparar la mezcla del andamiaje tisular. Asimismo, en algunas realizaciones, una solución que tiene un polímero disuelto en un disolvente puede premezclarse con una ATM en partículas, envasarse en cantidades deseadas y almacenarse para su uso posterior. Por tanto, la mezcla de andamiaje tisular final puede prepararse por anticipado a la formación del andamiaje tisular y/o antes del almacenamiento, transporte o venta.

La mezcla final de ATM en partículas, polímero y disolvente entonces puede colocarse en contacto con un medio acuoso (etapa 140), que permite al disolvente difundirse a partir de la mezcla para formar un andamiaje tisular desde el polímero y la ATM. En algunas realizaciones *in vivo*, la mezcla final puede colocarse en, sobre o próxima a un sitio tisular. Como se analiza anteriormente, pueden usarse andamiajes tisulares en una gama de aplicaciones y para el tratamiento de muchos sitios anatómicos diferentes. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la mezcla final puede colocarse en un defecto tisular en tejido blando. Tras la colocación de la mezcla *in situ*, el disolvente puede difundirse al tejido circundante o al espacio intersticial.

En realizaciones *ex vivo*, la mezcla final puede colocarse en contacto con un medio acuoso antes del implante. Por

ejemplo, en algunas realizaciones, la mezcla final puede colocarse en un molde que tiene una forma deseada. Un molde puede incluir un tubo Eppendorf, un tubo metálico, un tubo de inyección o un molde en forma de defecto tisular u orgánico en que se implantará el andamiaje tisular. En dichas realizaciones, la mezcla final y/o el molde pueden exponerse a un medio acuoso para facilitar la difusión del disolvente desde la mezcla. Por ejemplo, la mezcla final y/o el molde pueden aclararse, lavarse y/o remojarse en un baño para eliminar algo de o todo el disolvente en la mezcla final.

La difusión del disolvente puede dejar un andamiaje tisular distribuido uniformemente de ATM y polímero. El andamiaje tisular resultante puede consistir en partículas tisulares regenerativas incrustadas en un andamiaje de sustentación polimérica/sintética. En algunas realizaciones, el andamiaje tisular puede tener una forma tridimensional que es estable en tensión mecánica. Como se analiza anteriormente, los materiales del andamiaje pueden seleccionarse para conseguir un andamiaje tisular que tenga propiedades biomecánicas particulares. Por tanto, dependiendo del uso pretendido, el andamiaje tisular puede ser rígido, elástico, flexible y/o viscoelástico. En algunas realizaciones, los materiales del andamiaje pueden seleccionarse para formar un andamiaje tisular que tenga una dureza que sea sustancialmente similar a la del tejido en la ubicación diana. Además, en algunas realizaciones, el andamiaje tisular también puede resistir la migración desde la ubicación diana.

La figura 2 proporciona una ilustración ejemplar del implante de un andamiaje tisular para tratar un defecto 505 en un hueso largo 500 (por ejemplo, fémur o húmero). En diversas realizaciones, un andamiaje 180a puede implantarse en la ubicación del defecto 505. En algunas realizaciones, el andamiaje tisular 180a puede implantarse por inyección a través de una aguja o cánula 510 acoplada a una jeringa 515 que proporciona el material del andamiaje tisular.

Matrices tisulares acelulares

La expresión "matriz tisular acelular" (ATM), como se usa en el presente documento, se refiere en general a cualquier matriz tisular que esté sustancialmente libre de células y/o componentes celulares. La piel, partes de la piel (por ejemplo, dermis) y otros tejidos tales como los vasos sanguíneos, válvulas cardíacas, fascia, cartílago, hueso y tejido conjuntivo nervioso pueden usarse para crear matrices acelulares dentro del ámbito de la presente divulgación. Las matrices tisulares acelulares pueden ensayarse o evaluarse para determinar si están sustancialmente libres de células y/o componentes celulares de varias maneras. Por ejemplo, los tejidos procesados pueden inspeccionarse con microscopía óptica para determinar si permanecen células (vivas o muertas) y/o componentes celulares. Además, pueden usarse determinados ensayos para identificar la presencia de células o componentes celulares. Por ejemplo, pueden usarse ensayos de ADN u otros ácidos nucleicos para cuantificar los materiales nucleares restantes dentro de las matrices tisulares. En general, la ausencia de ADN u otros ácidos nucleicos restantes será indicativa de descelularización completa (es decir, eliminación de células y/o componentes celulares). Finalmente, pueden usarse otros ensayos que identifican componentes específicos celulares (por ejemplo, antígenos superficiales) para determinar si las matrices tisulares son acelulares. La piel, partes de la piel (por ejemplo, dermis) y otros tejidos tales como los vasos sanguíneos, válvulas cardíacas, fascia, cartílago, hueso y tejido conjuntivo nervioso pueden usarse para crear matrices acelulares dentro del ámbito de la presente divulgación.

En general, las etapas implicadas en la producción de una ATM incluyen recoger el tejido de un donador (por ejemplo, un cadáver humano o fuente animal) y eliminar las células en condiciones que conserven la función biológica y estructural. Por ejemplo, las funciones biológicas y estructurales deseadas incluyen la capacidad de sustentar el crecimiento interno celular y la regeneración tisular, proporcionar sustento mecánico (por ejemplo, a un sitio quirúrgico o defecto) y/o evitar un exceso de respuesta inmunológica, inflamación, fibrosis y/o cicatrización. En determinadas realizaciones, el procedimiento incluye tratamiento químico para estabilizar el tejido y evitar la degradación bioquímica y estructural junto con o antes de la eliminación celular. En diversas realizaciones, la solución estabilizante detiene o evita la degradación osmótica, hipóxica, autolítica y proteolítica, protege contra la contaminación microbiana y reduce el daño mecánico que puede producirse con tejidos que contienen, por ejemplo, componentes de músculo liso (por ejemplo, vasos sanguíneos). La solución estabilizante puede contener un tampón apropiado, uno o más antioxidantes, uno o más agentes oncóticos, uno o más antibióticos, uno o más inhibidores de proteasa y/o uno o más relajantes de músculo liso.

El tejido entonces se coloca en una solución de descelularización para eliminar las células viables (por ejemplo, células epiteliales, células endoteliales, células de músculo liso y fibroblastos) de la matriz estructural sin dañar la integridad biológica y estructural de la ATM (por ejemplo, matriz de colágeno). La integridad de la ATM puede ensayarse de varias maneras. Por ejemplo, puede usarse calorimetría diferencial de barrido para identificar cambios en la temperatura de transición térmica que indican reticulación (elevación en la temperatura de transición) o degradación de colágeno (disminución en la temperatura de transición). Además, la microscopía electrónica puede demostrar cambios en patrones de colágeno normales y ensayos de digestión enzimática pueden demostrar daño al colágeno. Además, la pérdida de diversos glucosaminoglucanos (por ejemplo, sulfato de condroitina y ácido hialurónico) puede indicar un cambio indeseable en la matriz tisular.

La solución de descelularización puede contener un tampón apropiado, sal, un antibiótico, uno o más detergentes (por ejemplo, TRITON X-100™, desoxicolato de sodio, monooleato de polioxietileno (20) sorbitán), uno o más agentes

para evitar la reticulación, uno o más inhibidores de proteasa y una o más enzimas. Los procedimientos adecuados para producir ATM se describen en, por ejemplo, H. Xu et al., A Porcine-Derived Acellular Dermal Scaffold That Supports Soft Tissue Regeneration: Removal of Terminal Galactose- α -(1,3)-Galactose and Retention of Matrix Structure. *Tissue Eng. Parte A*, Vol. 15, 1-13 (2009) ("Xu"). En particular, el párrafo bajo el subencabezado "materiales de ensayo" en la página 2 de Xu describe un procedimiento adecuado para producir ATM a partir de piel porcina.

Después del procedimiento de descelularización, la muestra tisular se lava minuciosamente con solución salina. En algunas realizaciones ejemplares, por ejemplo, cuando se usa material xenogénico, el tejido descelularizado entonces se trata durante una noche a temperatura ambiente con una solución de desoxirribonucleasa (DNasa). En algunas realizaciones, la muestra tisular se trata con una solución de DNasa preparada en tampón de DNasa (HEPES 20 mM (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico), CaCl₂ 20 mM y MgCl₂ 20 mM). Opcionalmente, puede añadirse una solución antibiótica (por ejemplo, gentamicina) a la solución de DNasa. Puede usarse cualquier tampón adecuado siempre que el tampón proporcione actividad DNasa adecuada.

Aunque una ATM puede prepararse a partir de uno o más individuos de la misma especie que el destinatario del andamiaje tisular, este no es necesariamente el caso. Por tanto, por ejemplo, una ATM del andamiaje tisular puede prepararse a partir de tejido porcino. Las especies que puede servir como receptoras de la ATM y los donadores de tejidos u órganos para la producción de la ATM incluyen, sin limitación, mamíferos, tales como seres humanos, primates no humanos (por ejemplo, monos, babuinos o chimpancés), cerdos, vacas, caballos, cabras, ovejas, perros, gatos, conejos, cobayas, jerbos, hámsteres, ratas o ratones.

La eliminación de los epítomos Gal α 1-3Gal β 1-(3)4GlcNAc-R ("epítomos α -gal") de la ATM puede disminuir la respuesta inmunitaria contra la ATM. El epítomo α -gal se expresa en mamíferos que no son primates y en plátirinos (monos de Sudamérica) en macromoléculas tales como glucoproteínas de los componentes extracelulares. U. Galili et al., *J. Biol. Chem.* 263: 17755 (1988). Sin embargo, este epítomo está ausente en primates del viejo mundo (monos de Asia y África y simios) y seres humanos. Los anticuerpos antigal se producen en seres humanos y primates como resultado de una respuesta inmunitaria contra las estructuras glucídicas de epítomo α -gal en bacterias gastrointestinales. U. Galili et al., *Infect. Immun.* 56: 1730 (1988); R. M. Hamadeh et al., *J. Clin. Invest.* 89: 1223 (1992).

Como los mamíferos que no son primates (por ejemplo, cerdos) producen epítomos α -gal, el xenotrasplante de ATM de estos mamíferos a primates a menudo provoca activación inmunológica a causa de los anticuerpos antigal de los primates que se unen a estos epítomos en la ATM. U. Galili et al., *Immunology Today* 14: 480 (1993); M. Sandrin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 11391 (1993); H. Good et al., *Transplant. Proc.* 24: 559 (1992); B. H. Collins et al., *J. Immunol.* 154: 5500 (1995). Además, el xenotrasplante provoca activación principal del sistema inmunitario para producir cantidades aumentadas de anticuerpos antigal de alta afinidad. Por consiguiente, en algunas realizaciones, cuando se usan animales que producen epítomos α -gal como fuente tisular, la eliminación sustancial de epítomos α -gal de las células y de los componentes celulares de la ATM, y la prevención de la reexpresión de epítomos α -gal celulares puede disminuir la respuesta inmunitaria contra la ATM asociada con la unión de anticuerpos antigal a epítomos α -gal.

Para eliminar los epítomos α -gal, después de lavar el tejido minuciosamente con solución salina para eliminar la solución de DNasa, la muestra tisular puede someterse a uno o más tratamientos enzimáticos para eliminar determinados antígenos inmunógenos, si están presentes en la muestra. En algunas realizaciones, la muestra tisular puede tratarse con una enzima α -galactosidasa para eliminar los epítomos α -gal si están presentes en el tejido. En algunas realizaciones, la muestra tisular se trata con α -galactosidasa a una concentración de 300 u/l preparada en tampón fosfato 100 mM a pH 6.0. En otras realizaciones, la concentración de α -galactosidasa se aumenta hasta 400 u/l para la eliminación adecuada de los epítomos α -gal del tejido recogido. Puede usarse cualquier concentración enzimática adecuada y tampón siempre que se consiga suficiente eliminación de los antígenos.

Como alternativa, en lugar de tratar el tejido con enzimas, pueden seleccionarse animales que se han modificado genéticamente para que carezcan de uno o más epítomos antigénicos como fuente de tejido. Por ejemplo, pueden seleccionarse animales (por ejemplo, cerdos) que se han modificado genéticamente para que carezcan del resto de α -galactosa terminal como fuente de tejido. Para descripciones de animales apropiados véase la solicitud de Estados Unidos, en trámite junto con la presente, n.º de serie 10/896 594 y la patente de Estados Unidos n.º 6 1 66 288. Además, se describen en Xu determinados procedimientos ejemplares de procesamiento de tejidos para producir matrices acelulares con o sin cantidades reducidas de o ausencia de restos de alfa-1,3-galactosa.

Después de formar la ATM, pueden sembrarse células viables histocompatibles opcionalmente en la ATM para producir un injerto que pueda remodelarse adicionalmente por el hospedador. En algunas realizaciones, las células viables histocompatibles pueden añadirse a las matrices por técnicas de cocultivo celular *in vitro* convencionales antes del trasplante, o por repoblación *in vivo* después del trasplante. La repoblación *in vivo* puede ser por parte de las propias células del destinatario que migran a la ATM o por infusión o inyección de células obtenidas del destinatario o células histocompatibles de otro donador en la ATM *in situ*. Pueden usarse diversos tipos celulares, incluyendo células madre embrionarias, células madre adultas (por ejemplo, células madre mesenquimatosas) y/o

células neuronales. En diversas realizaciones, las células pueden aplicarse directamente a la parte interna de la ATM justo antes o después del implante. En determinadas realizaciones, las células pueden colocarse dentro de la ATM a implantar, y cultivarse antes del implante. En algunas realizaciones, pueden añadirse células viables al andamiaje tisular en el sitio anatómico deseado después de que el disolvente haya difundido desde el andamiaje.

5 En determinadas realizaciones, la ATM puede incluir ALLODERM® o STRATTICE™, LifeCell Corporation, Branchburg, NJ, que son matrices dérmicas acelulares humanas y porcinas, respectivamente. Ejemplos de dichos materiales pueden encontrarse en las patentes de Estados Unidos n.º 6 933 326 y 7 358 284.

10 Matriz tisular acelular en partículas

Puede usarse el siguiente procedimiento para producir matrices tisulares acelulares en partículas usando ALLODERM®, STRATTICE™ u otras matrices tisulares acelulares adecuadas. Después de la eliminación del envase, la ATM puede cortarse en tiras usando un mallado Zimmer equipado con una rueda de corte "continua" sin interrupción. Las tiras largas resultantes de ATM pueden cortarse en longitudes de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 centímetros de longitud.

Puede ensamblarse un homogeneizador y sonda de homogeneizador esterilizada, tal como un homogeneizador LabTeck Macro disponible en OMNI International, Warrenton Va., y enfriarse hasta temperaturas criogénicas usando nitrógeno líquido estéril que se vierte en la torre del homogeneizador. Una vez que el homogeneizador a alcanzado temperaturas criogénicas, la ATM preparada previamente en tiras como se indica anteriormente puede añadirse a la torre de homogeneización que contiene nitrógeno líquido estéril. El homogeneizador entonces puede activarse para fracturar criogénicamente las tiras de ATM. El tiempo y la duración de la etapa de fraccionamiento criogénico dependerá del homogeneizador utilizado, el tamaño de la cámara de homogeneización, la velocidad y el tiempo a la que se maneja el homogeneizador y debe poder determinarse por un experto en la materia por simple variación de los parámetros para conseguir los resultados deseados.

El material de ATM en partículas crio fracturado puede clasificarse por tamaños de partícula lavando el producto del homogeneizador con nitrógeno líquido a través de una serie de cribas metálicas que también se han enfriado hasta temperaturas de nitrógeno líquido. Puede utilizarse una combinación de cribas dentro de la torre de homogeneización del tipo descrito anteriormente en que las partículas se lavan y clasifican en primer lugar para excluir las partículas de tamaño excesivo y después para excluir las partículas de tamaño insuficiente.

Una vez aislada, la ATM en partículas puede retirarse y colocarse en un vial para liofilización una vez se ha evaporado el nitrógeno líquido estéril. Esto puede asegurar que se elimine cualquier humedad residual que pueda haberse absorbido durante el procedimiento anterior.

El producto final puede ser un polvo que tiene un tamaño de partícula de aproximadamente 1 micrómetro a aproximadamente 900 micrómetros o un tamaño de partícula de aproximadamente 30 micrómetros a aproximadamente 750 micrómetros. Las partículas se distribuyen sobre una media de aproximadamente de 150-300 micrómetros. El material se rehidrata fácilmente por suspensión en solución salina normal u otro agente rehidratante adecuado similar. La ATM rehidratada puede resuspenderse en solución salina normal o cualquier otro vehículo farmacéuticamente compatible adecuado.

45 En determinadas realizaciones, la ATM en partículas puede incluir CYMETRA®, LifeCell Corporation, Branchburg, NJ, que es una forma inyectable de ALLODERM®. Pueden encontrarse ejemplos de dicho material en las patentes de Estados Unidos n.º 7 358 284 y 6 933 326.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para explicar mejor las diversas realizaciones y no debe interpretarse de ninguna manera que limitan el ámbito de la presente divulgación.

Ejemplos

Ejemplo 1

55 El efecto del implante de un andamiaje tisular regenerativo con ATM en partículas (pADM) derivada de tejido dérmico porcino se comparó con el implante del polímero preformado en solitario de acuerdo con los procedimientos descritos a continuación.

60 Se crearon andamiajes tisulares regenerativos a partir de ATM en partículas. La ATM se preparó a partir de tejido dérmico porcino y se liofilizó. La ATM seca se cortó en trozos de ~1 cm² y se colocó en un vial de CrioMill. El vial entonces se colocó en un molino de congelación SPEX 6800 que se había preenfriado con nitrógeno líquido y se sometió a un protocolo de crio fractura. La ATM en partículas entonces se retiró del vial y se mantuvo en condiciones de almacenamiento en seco.

65 PCL combinada con pADM y P4HB combinado con pADM se solubilizaron cada uno en dioxano y NMP de acuerdo

con el siguiente procedimiento. El polímero seleccionado se solubilizó en el disolvente seleccionado a una concentración de un 10 % (p/v). Después se extrajeron 0,5 ml de esta solución a una jeringa de 1 ml. Se añadieron 150 mg de pADM a una jeringa de 3 ml. Se colocó un conector en la jeringa de 1 ml y se eliminó todo el aire del cilindro. El émbolo de la jeringa de 3 ml se retrocedió hasta la marca de 2 ml y la jeringa se golpeó para soltar el polvo de pADM. La jeringa de 3 ml entonces se conectó a la jeringa de 1 ml. La solución de la jeringa de 1 ml se inyectó lentamente a la jeringa de 3 ml, permitiendo que la pADM quedara húmeda. La jeringa de 3 ml se golpeó repetidamente hasta que la pADM parecía completamente húmeda. El material se transfirió entre las jeringas de 1 ml y 3 ml aproximadamente 10 veces para mezclar uniformemente la solución de polímero y la pADM, y el material se dejó en la jeringa de 3 ml cuando se finalizó. La jeringa de 1 ml se desconectó y el émbolo de la jeringa de 3 ml se retrajo. La jeringa de 3 ml se golpeó para compactar los contenidos contra el émbolo. El émbolo se presionó lentamente, expulsando todo el aire de la jeringa de 3 ml. La jeringa de 1 ml entonces se volvió a conectar y se transfirió la mezcla de polímero-pADM repetidamente hacia delante y hacia detrás entre las jeringas durante aproximadamente 2 minutos. La mezcla de polímero-pADM se transfirió a la jeringa de 1 ml y se adhirió una aguja/cánula para el suministro.

Las diversas mezclas de polímero-pADM descritas anteriormente, las construcciones que comprenden únicamente PCL y las construcciones que comprenden únicamente P4HB se implantaron cada una en una posición subdérmica a través de una incisión pequeña en la superficie dorsal de ratas inmunocompetentes (*Rattus norvegicus*; rata Lewis). Cuatro semanas (fig. 3A-F) y doce semanas (fig. 4A-F) después del implante, se recogieron los explantes y se lavaron con PBS y se fijaron en formol al 10 %. El tejido fijado se incluyó en parafina y se tiñeron secciones de muestras de matriz tisular con hematoxilina y eosina (H&E) usando procedimientos convencionales. D.C. Sheehan y B.B. Hrapchak, Theory and Practice of Histotechnology, 2.^a ed., Columbus, OH, Battelle Press (1987).

Las muestras entonces se observaron al microscopio a aumento 400 x (fig. 3A-F y 4A-F). Las figuras 3A-C representan los resultados de PCL en solitario, con pADM y dioxano, y con pADM y NMP, respectivamente, después de 4 semanas. Las figuras 3D-F representan los resultados de P4HB en solitario, con pADM y dioxano y con pADM y NMP, respectivamente, después de 4 semanas. Asimismo, las figuras 4A-C representan los resultados de PCL en solitario, con pADM y dioxano y con pADM y NMP, respectivamente, después de 12 semanas. Y las figuras 4D-F representan los resultados de P4HB en solitario, con pADM y dioxano y con pADM y NMP, respectivamente después de 12 semanas. El análisis histológico de los implantes mostró que PCL y P4HB en presencia de pADM, cuando se solubilizaban en dioxano o NMP, tenían una respuesta inflamatoria atenuada en comparación con los explantes de PCL y P4HB en solitario.

Ejemplo 2

Se evaluó el implante de un andamiaje tisular regenerativo en el cóndilo femoral de un conejo. Se preparó un implante que comprendía BHA, pADM y NMP de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 1. Se mezcló BHA con pADM en un disolvente NMP y se inyectó en un defecto osteocondral de aproximadamente 3,5 x 3 mm creado en el cóndilo femoral de un conejo. Las muestras se retiraron después de 4 semanas y se evaluaron las respuestas celulares usando tinción histológica rutinaria con hematoxilina y eosina. Las muestras se observaron al microscopio a aumento 20 x, 100 x y 400 x (fig. 5A-C, respectivamente). También se tomó una foto del cóndilo femoral que muestra el implante del andamiaje tisular 180b a las 12 semanas (fig. 6). Los resultados mostraron la persistencia del implante y una respuesta de tejido regenerativo como se demuestra por el depósito de cartílago de tipo hialino en el sitio del defecto.

REIVINDICACIONES

1. Un kit que comprende:
 - 5 una matriz tisular acelular (ATM) en partículas;
un disolvente miscible en agua; y
un polímero que se puede disolver en el disolvente
en el que después de mezclar la ATM, el polímero y el disolvente y colocar la mezcla en contacto con un medio
acuoso, el disolvente miscible en agua puede difundirse a partir de la mezcla para permitir que la mezcla forme
10 un andamiaje tisular a partir del polímero y la ATM.
 2. El kit de la reivindicación 1, en el que el disolvente es biocompatible.
 3. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que el disolvente comprende al menos uno de dioxano,
15 N-metil-2-pirrolidona o dimetilsulfóxido, o combinaciones de los mismos.
 4. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el polímero comprende policaprolactona.
 5. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el polímero comprende poli-4-hidroxibutirato.
20
 6. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el polímero comprende un derivado de éster
bencílico de ácido hialurónico.
 7. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la ATM en partículas comprende partículas de
25 tamaño uniforme.
 8. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la ATM en partículas comprende una ATM dérmica,
una matriz tisular de cartílago, una matriz tisular de hueso o combinación de las mismas.
 - 30 9. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la ATM en partículas comprende ATM de dos o más
tipos de tejidos diferentes.
 10. El kit de la reivindicación 9, en el que los dos o más tipos diferentes de tejidos comprenden dermis y cartílago,
cartílago y hueso, matrices tisulares humanas, matrices tisulares porcinas o matrices tisulares humanas y matrices
35 tisulares porcinas.
 11. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el andamiaje tisular puede sustentar la
regeneración de cartílago.
 - 40 12. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el polímero comprende al menos uno de entre
policaprolactona o poli-4-hidroxibutirato y el disolvente comprende al menos uno de entre dioxano o N-metil-2-
pirrolidona.
 - 45 13. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el polímero comprende un derivado de éster
bencílico de ácido hialurónico y el disolvente comprende al menos uno de entre dimetilsulfóxido o N-metil-2-
pirrolidona.

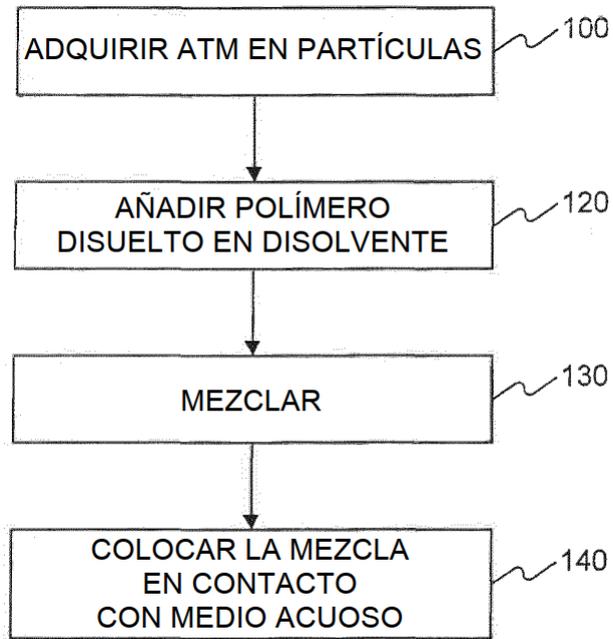


FIG. 1

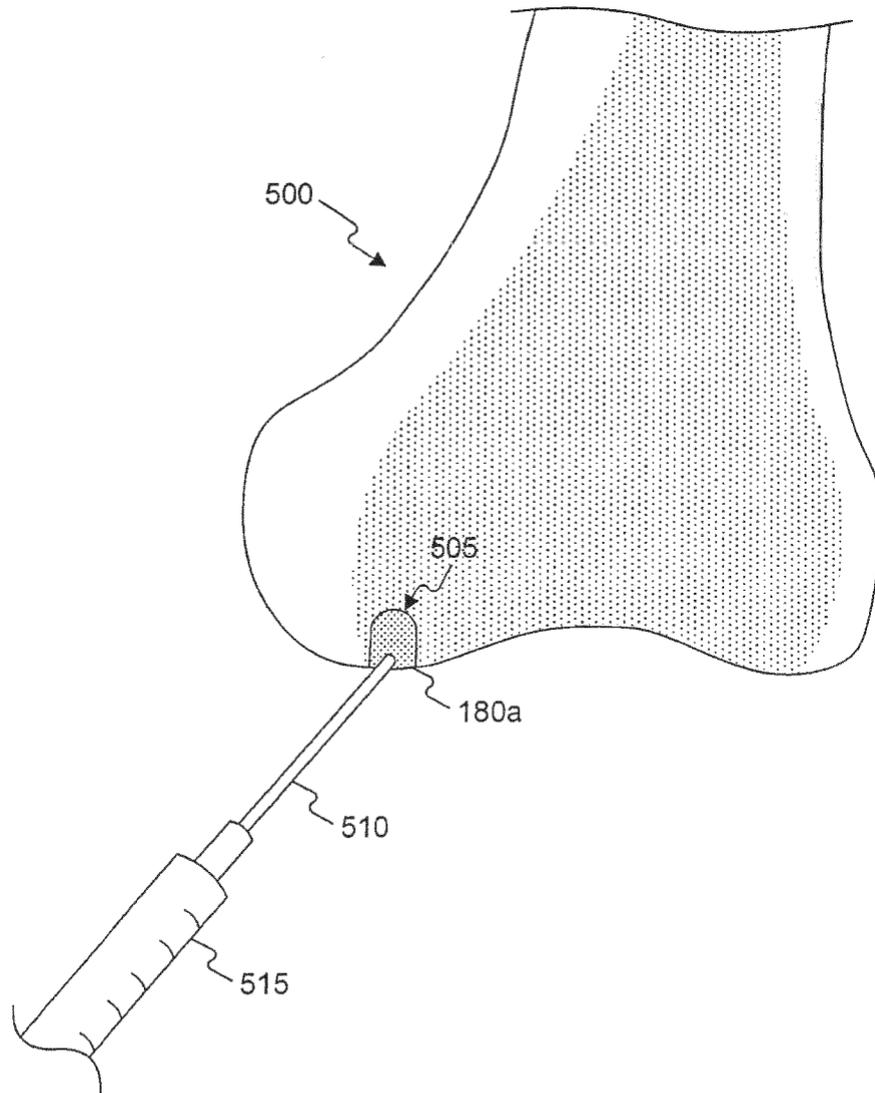


FIG. 2

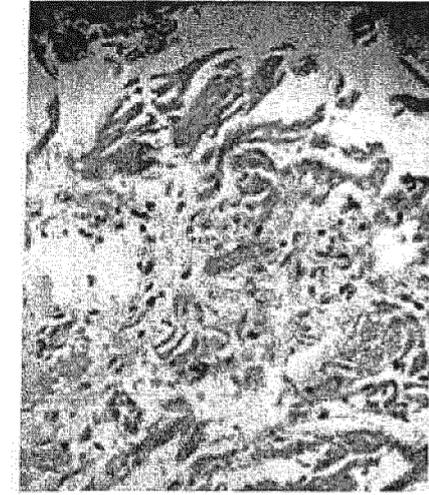


FIG. 3A

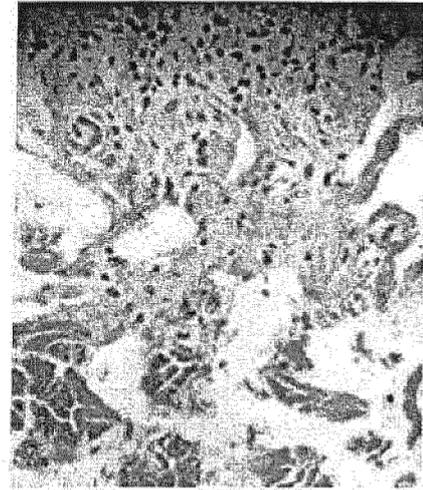


FIG. 3B

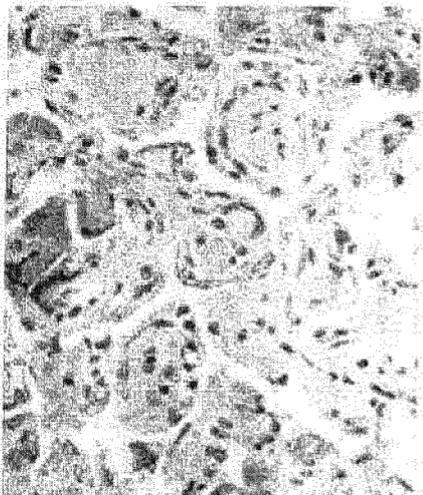


FIG. 3C

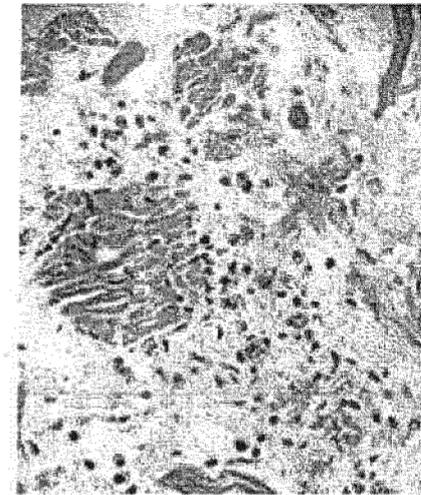


FIG. 3D

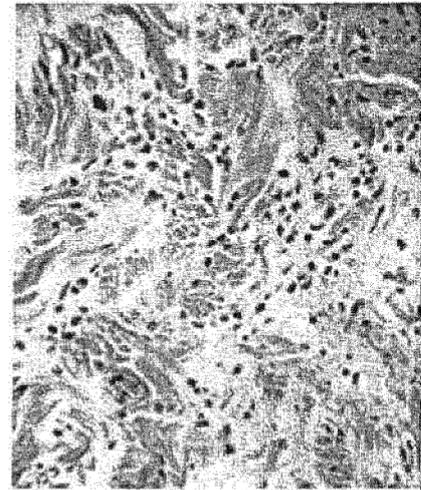


FIG. 3E

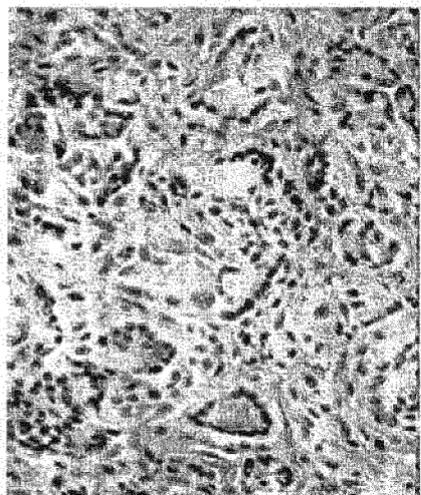


FIG. 3F

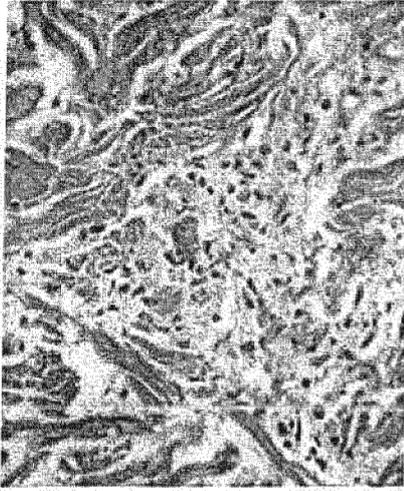


FIG. 4C



FIG. 4F

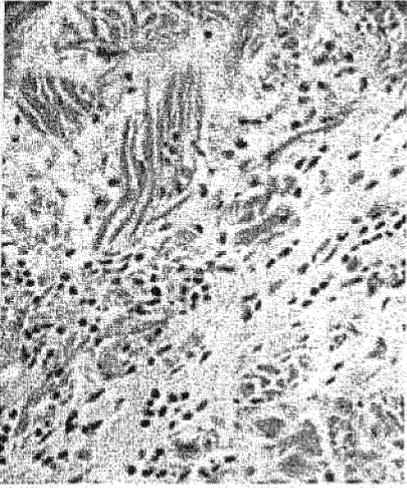


FIG. 4B

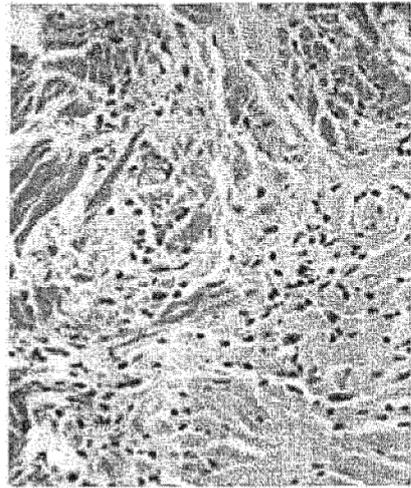


FIG. 4E

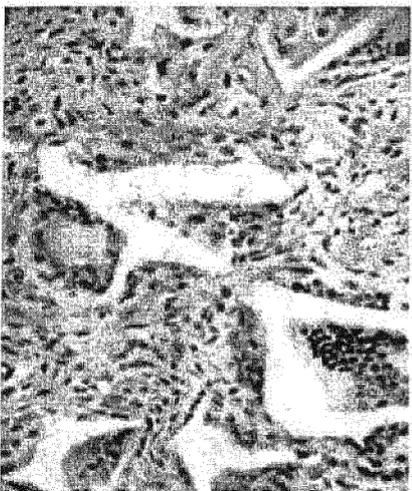


FIG. 4A

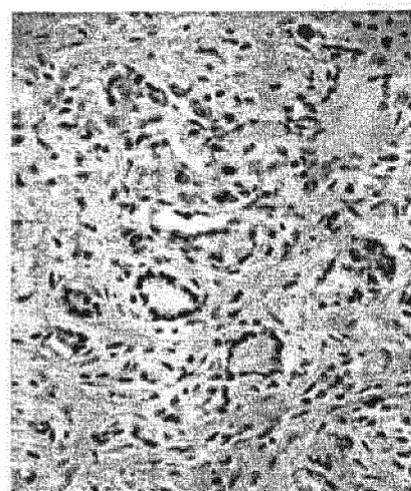


FIG. 4D



FIG. 5A

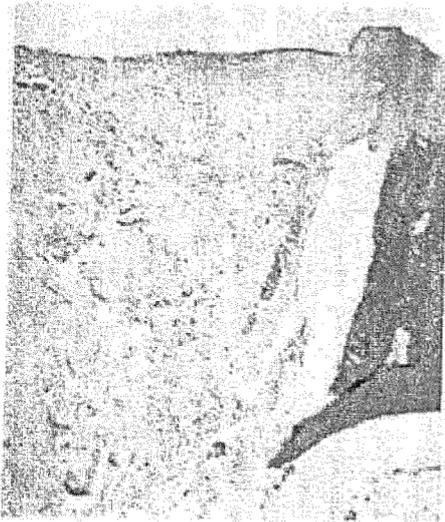


FIG. 5B

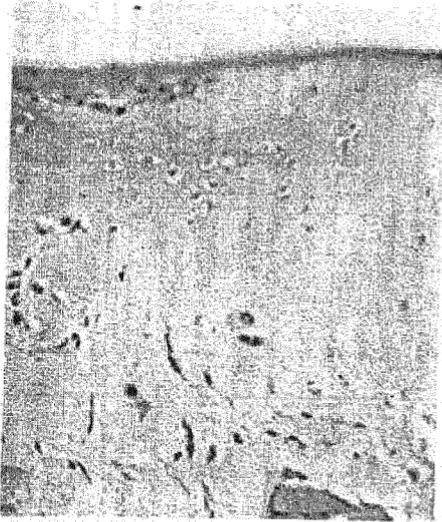


FIG. 5C

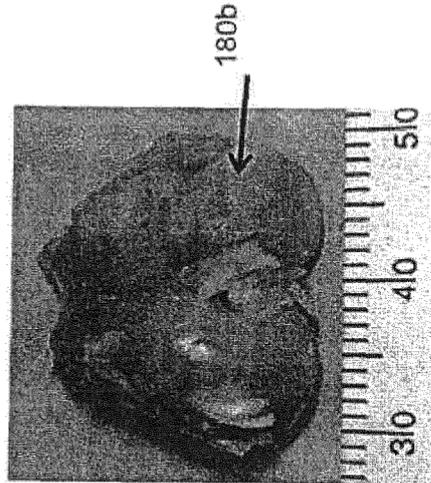


FIG. 6