

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 764 146**

51 Int. Cl.:

A61L 27/36 (2006.01)

A61L 27/52 (2006.01)

A61L 27/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.02.2014 PCT/US2014/015214**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.08.2014 WO14124203**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.02.2014 E 14708706 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2019 EP 2953659**

54 Título: **Métodos para fabricar geles bioactivos a partir de material de la matriz extracelular**

30 Prioridad:

08.02.2013 US 201361762437 P

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

02.06.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KENTNER, KIMBERLY, A.;
STUART, KATHERINE, A. y
JANIS, ABRAM, D.**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 764 146 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

Métodos para fabricar geles bioactivos a partir de material de la matriz extracelular

5 CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención está relacionada con los métodos para fabricar geles bioactivos a partir de material de la matriz extracelular y con sus usos para reparar los tejidos de un paciente.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Los andamios biológicos compuestos de material de matriz extracelular (MEC o ECM, por las siglas en inglés de 'extracellular matrix') se han usado para la reparación o restauración de diversos tejidos, incluyendo el tracto urinario inferior, el esófago, el miocardio y los tejidos musculotendinosos, lo que a menudo conlleva una remodelación reconstructiva de tejidos específicos, de manera que la formación de tejido cicatricial es mínima o nula.

[0003] Si bien los usos de ECM como andamios para la ingeniería de tejidos clínica y preclínica y los enfoques de la medicina regenerativa para la reconstrucción tisular son muy prometedores, sigue habiendo retos en cuanto al proceso de fabricación de geles bioactivos a partir de ECM que conserven su bioactividad.

[0004] Los métodos para fabricar geles bioactivos a partir de ECM que se describen en la técnica anterior requieren el uso de enzimas y exigen mucho tiempo, ya que requieren pasos o etapas de purificación agresiva, algo que puede conllevar una reducción de la bioactividad de los geles y puede entrañar unos obstáculos de regulación adicionales para su puesta en el mercado.

[0005] Por ello, existe una necesidad de fabricar geles bioactivos a partir de ECM de manera que se eviten los engorrosos y complicados pasos o etapas de preparación y purificación pero se obtengan geles que conserven la bioactividad del material original.

30 RESUMEN DE LA INVENCION

[0006] De manera general, la presente invención está relacionada con los métodos mejorados para fabricar geles bioactivos a partir de ECM que conserven la bioactividad suficiente para ayudar realmente en la reparación de tejidos. La presente invención utiliza reactivos que no entrañan cargas regulatorias adicionales para la autorización o aprobación comercial del gel de la invención. Así, la invención describe métodos para fabricar geles bioactivos a partir de una ECM, tal y como se especifica en las reivindicaciones anexas.

[0007] La ventaja que proporcionan los métodos de fabricación de geles bioactivos descritos previamente es que se evitan los pasos de purificación agresiva, que son nocivos para la bioactividad, son laboriosos y tediosos de desarrollar, y aumentan las cargas regulatorias (por ejemplo, la aprobación por parte de la FDA o 'Administración de Alimentos y Medicamentos' de Estados Unidos).

45 BREVE DESCRIPCION DE LAS ILUSTRACIONES

[0008]

La Figura 1 (FIG. 1) muestra el contenido de FGF-2 (pg/mg) de geles que cumplen diversas condiciones de solubilización en NaOH de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención. Todos los geles que no están señalados con un '% w/v' (porcentaje (%)) de p/v se obtuvieron con un 7,0% p/v de UBM respecto a NaOH. Todos los geles de la Figura 1 se obtuvieron con un 7,0% p/v de UBM respecto a NaOH.

La Figura 2 muestra el contenido de VEGF (pg/mg) de geles que cumplen diversas condiciones de solubilización en NaOH de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención. Todos los geles que no están señalados con un '% w/v' (porcentaje (%)) de p/v se obtuvieron con un 7,0% p/v de UBM respecto a NaOH. Todos los geles de la Figura 2 se obtuvieron con un 7,0% p/v de UBM respecto a NaOH.

DESCRIPCION DETALLADA

[0009] La presente invención se define y se delimita en las reivindicaciones anexas. La presente invención está dirigida a los métodos para fabricar geles bioactivos a partir de ECM, es decir, geles que conservan la bioactividad suficiente para ayudar realmente en la reparación de tejidos reduciendo el tiempo necesario para dicha reparación, reduciendo la formación de tejido cicatricial y mejorando la reparación o restauración del tejido dañado hasta que alcanza sus funciones y su estructura nativa u original previas a los daños en comparación con tejidos dañados que no se han tratado con los geles bioactivos de acuerdo con la invención. El gel de la invención y los métodos de fabricación que se describen en el presente documento proporcionan 'andamios' para la ingeniería de tejidos clínica y preclínica y los métodos o enfoques de la medicina regenerativa para la reconstrucción tisular. La bioactividad del

gel de ECM de acuerdo con la invención es de aproximadamente entre un 0 y un 100%, un 25-75%, un 10-25%, menos de un 10%, menos de un 5% o menos de 1% de la bioactividad de una o más moléculas bioactivas presentes en la ECM nativa u original a partir de la cual se obtuvo el gel. Tal y como se describirá con más detalle más adelante, estos métodos de fabricación aprovechan un nuevo descubrimiento según el cual pueden crearse geles bioactivos a partir de ECM solubilizando una ECM particularizada en un entorno básico (con un pH mayor que 7), de manera que cuando se neutraliza con ácido proporciona geles bioactivos.

[0010] La ECM puede obtenerse de capas de tejidos de mamífero nativos que incluyen -pero no se limitan a- la submucosa, la dermis y la membrana basal epitelial, o de tejidos como la aponeurosis, la fascia, el tendón, el ligamento, el músculo liso, el músculo esquelético y las ECM de tratamiento de sitio específico. La fuente de tejido de mamífero nativo puede ser, por ejemplo, porcina, bovina, ovina, alogénica o autogénica. De acuerdo con la presente invención, la ECM se deriva de una capa de tejido de mamífero seleccionado de un grupo que incluye los siguientes: la submucosa del intestino delgado (o SIS, por sus siglas en inglés), la submucosa de la vejiga urinaria (UBS) o la matriz de la vejiga urinaria (UBM), incluyendo la membrana basal epitelial o la membrana basal del hígado (LBM), que se describen en las Patentes de EE. UU. n^{os} 6,576,265, 6,579,538, 5,573,784, 5,554,389, 4,956,178 y 4,902,508. En la presente invención, la ECM se deriva u obtiene de tejido de mamífero y comprende componentes bioactivos del material de la matriz extracelular que se disponen de una manera y en cantidades similares a las del tejido en su forma nativa u original.

[0011] De acuerdo con el método de la invención, la ECM está particularizada, es decir, el tamaño de las partículas de ECM es de entre alrededor de 1 μm y alrededor de 1000 μm . En una realización, la particularización de la ECM antes de someter la ECM a un entorno básico proporciona homogeneidad a la ECM, es decir, proporciona una composición más uniforme en comparación con la ECM de animales individuales, lo cual reduce el impacto de la variabilidad entre donantes. En otra realización, la particularización de la ECM facilita solubilizar la matriz en un entorno básico, ya que aumenta el área de superficie respecto al ratio o relación de volumen.

[0012] El producto de ECM particularizada, es decir, la ECM particularizada, se fabrica moliendo/triturando o practicando cualquier otro tipo de proceso de reducción de tamaño a la ECM, que, habitualmente -pero no de forma exclusiva-, se proporciona en forma de lámina o capa. El material particulado resultante puede tener cualquier intervalo de densidad deseado, por ejemplo, alrededor de 0,1 g/cm³ - 10 g/cm³, alrededor de 0,1 g/cm³ - 1 g/cm³ o alrededor de 1 g/cm³, y las partículas pueden tener un tamaño de aproximadamente 1 micra - 1000 micras, aproximadamente 200-700 micras, aproximadamente 300-600 micras o aproximadamente 400 micras, por ejemplo.

[0013] Un entorno básico -o alcalino- se proporciona mediante soluciones de compuestos alcalinos. Los compuestos alcalinos que pueden usarse de acuerdo con la invención son los hidróxidos metálicos, que incluyen -pero no se limitan a- LiOH, NaOH, KOH, RbOH y CsOH. Los compuestos alcalinos que pueden usarse de acuerdo con la invención también incluyen las bases débiles, como, por ejemplo -pero sin limitarse a-, amoníaco (NH₃), piridina (C₅H₅N), hidroxilamina (H₂NOH), metilamina (NH₂CH₃) y similares. Los compuestos alcalinos se usan generalmente en concentraciones de entre 0,1 Molar y 1,0 Molar, si bien en una realización de la presente invención también se contemplan concentraciones más bajas que 0,1 Molar o más altas que 1,0 Molar.

[0014] Las concentraciones de ECM particularizada respecto a NaOH (p/v) son de entre un 0,1% y un 20%, más particularmente entre un 0,5% y un 11% y, más particularmente, de un 7%.

[0015] El paso de solubilización a 4° C (es decir, la digestión) de la ECM particularizada puede alargarse durante un período de tiempo que va desde unos pocos minutos hasta varias horas (por ejemplo, de 30 minutos a 48 horas) o días (por ejemplo, 3-7 días), de 30 minutos a 12 horas, 12-24 horas, de 24 horas a 36 horas, de 36 horas a 48 horas o de dos días a siete días. En una realización de la invención, se contempla que el período de tiempo necesario para el paso de digestión viene determinado por el tamaño del material de la matriz extracelular particularizada y/o la concentración del hidróxido metálico utilizado para la solubilización. Por ejemplo, si la concentración de un compuesto alcalino -como NaOH- es baja, más larga será la incubación, es decir, se necesitará más tiempo para la solubilización. Tras el paso de solubilización en una solución básica, la ECM solubilizada (esto es, la forma en gel) se neutraliza hasta alcanzar un pH neutro utilizando concentraciones molares, por ejemplo concentraciones equimolares de un ácido en un volumen suficiente para que la ECM solubilizada alcance un pH de entre 6.8 y 7.4. Los ácidos que ayudan a neutralizar el gel de ECM pueden seleccionarse de entre ácidos débiles o ácidos fuertes. La selección de los ácidos para el paso de neutralización depende de las sales que se producen cuando un ácido reacciona con el entorno básico durante la neutralización. La sal resultante debería ser biocompatible. Por ejemplo, en una realización de la invención, se usa ácido clorhídrico (HCl) para neutralizar el entorno básico creado por la base NaOH, ya que la sal resultante (esto es, NaCl) es clínicamente aceptable.

[0016] Tras la neutralización, los geles se someten a diversos períodos de reposo (1-48 horas, 12-36 horas, o 36-48 horas) para potenciar o fomentar la renaturalización de los componentes bioactivos desnaturalizados. Generalmente, los períodos de reposo se realizan agitando o removiendo -o no- el gel en una habitación fría (esto es, con una temperatura de alrededor de 4° C) y, de manera alternativa, a temperatura ambiente. Los períodos de reposo pueden alargarse más de 48 horas hasta unos pocos días, por ejemplo 3-7 días, para fomentar la reestructuración del gel.

5 **[0017]** De acuerdo con el método de la invención, una vez que el gel se ha neutralizado y se ha sometido al mencionado período de reposo, opcionalmente puede someterse a uno o más pasos que incluyen ciclos de liofilización o secado por congelación para facilitar la conversión del gel neutralizado en un polvo (que tiene un pH neutro). El polvo puede volver a convertirse en gel sin alterar su bioactividad mezclándolo con un líquido, como agua, o una solución tampón que conserva el pH neutro del gel. Asimismo, la preservación de la bioactividad de las ECM puede obtenerse mediante liofilización.

10 **[0018]** En una realización de acuerdo con la invención, la ECM solubilizada y secada por congelación se reconstituye usando agua y dos jeringas de 3 mL. Una jeringa contiene el gel liofilizado, la otra contiene agua, y se mezclan mediante un conector situado entre ambas jeringas. La mezcla se introduce y se extrae varias veces para conseguir el mezclado. Pueden probarse diversas concentraciones de ECM en NaOH para conocer las propiedades de manejo (esto es, la inyectabilidad, la pegajosidad, la viscosidad) a fin de determinar su capacidad para aplicarse utilizando el sistema de dos jeringas. La consistencia final de todos los geles es similar a la de la espuma, y cada uno se adhiere a la superficie a la que se aplica -a la vez que conserva su consistencia-, lo cual puede resultar conveniente en condiciones de gravedad cero, por ejemplo en el espacio. Por consiguiente, el gel de la invención puede usarse para la reparación de tejidos durante la exploración espacial.

20 **[0019]** En una realización, al gel de ECM neutralizada y solubilizada se le añade ECM particularizada para aumentar la viscosidad o la bioactividad del gel. Por ejemplo, el polvo de UBM con un tamaño de aproximadamente 1 micra - 1000 micras, aproximadamente 200-700 micras, aproximadamente 300-600 micras, aproximadamente de 100 a 400 micras, de aproximadamente 200 micras o de aproximadamente 400 micras se añade a un gel de UBM que se ha preparado siguiendo los métodos explicados anteriormente para aumentar la viscosidad o la bioactividad del gel, es decir, el gel resulta más fácil de manejar o es capaz de producir una mayor concentración de moléculas bioactivas, por ejemplo factores de crecimiento como FGF, por ejemplo FGF-2, CTGF o VEGF. El polvo de ECM puede añadirse antes, durante o después de neutralizar los geles.

30 **[0020]** En una realización particular, se usa un 7,0% de UBM para NaOH de 100 mM solubilizado a 4° C durante 24 horas para fabricar el gel bioactivo. Puede añadirse polvo de UBM al gel para aumentar la viscosidad y/o la bioactividad.

DEMOSTRACIONES

35 **[0021]** Para las siguientes demostraciones o ejemplificaciones, puede usarse cualquier número de productos de ECM como, por ejemplo -pero sin limitarse a-, una o más de entre la submucosa de la vejiga urinaria -aislada-, la submucosa del intestino delgado o la dermis, por ejemplo. Solamente aquellas ejemplificaciones que entran dentro del alcance de las reivindicaciones anexas son acordes a la invención.

40 **[0022]** En las siguientes ejemplificaciones, la UBM, una ECM aislada de la vejiga urinaria y que tiene una membrana basal epitelial, se usa como ECM ejemplar. No obstante, la invención que se desvela en el presente documento no está limitada a la UBM y puede aplicarse a cualquier ECM aislada.

45 **[0023]** En una ejemplificación, se crearon geles usando diversas concentraciones de UBM particularizada (0,5-11% p/v) solubilizada en diversas concentraciones de NaOH (0,1-1,0 M). La UBM se solubilizó durante diversos períodos de tiempo (1-48 horas) en las respectivas concentraciones de UBM y NaOH a 4° C. Para comprobar si la UBM podía reestructurarse tras la solubilización, también se fabricaron geles utilizando diversos períodos de reposo (1-48 horas) tras la neutralización.

50 **[0024]** Los geles de UBM creados del modo explicado previamente se analizaron 'in vitro' para conocer su contenido molecular bioactivo. En este estudio se analizó el contenido del factor de crecimiento (por ejemplo, FGF-2, CTGF, VEGF). En las Figuras 1 y 2 se muestran los datos del contenido de FGF-2 y VEGF tras la solubilización respecto a la estructura de cada gel. Los geles con una concentración menor (1-6%) no se muestran, pero obtuvieron unos resultados similares. Tal y como se muestra en las Figuras 1 y 2, los niveles de FGF-2 y VEGF -y, particularmente, los de VEGF- aumentaron en estos estudios.

55 **[0025]** En un estudio se descubrió que utilizar UBM con un 7,0 % p/v respecto a diversos rangos o intervalos de NaOH con 24 horas de solubilización a 4° C y sin períodos de reposo había tenido una influencia significativa en los contenidos de FGF-2 y VEGF en el gel. Los contenidos de FGF-2 y VEGF se midieron mediante procedimientos de ELISA estándares.

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un método para fabricar un gel bioactivo a partir de un material de matriz extracelular (MEC o ECM, por las siglas en inglés de 'extracellular matrix'), de manera que incluye:
- 10 a) proporcionar un material de matriz extracelular obtenido de una capa de tejido de mamífero seleccionado de un grupo que incluye los siguientes: la submucosa del intestino delgado, la submucosa de la vejiga urinaria, la matriz de la vejiga urinaria -que incluye la membrana basal epitelial- y la membrana basal del hígado, y que comprende componentes bioactivos del material de la matriz extracelular que se disponen de una manera y en cantidades similares a las del tejido en su forma nativa u original;
- 15 b) particularizar el material de matriz extracelular de a);
c) solubilizar el material de matriz extracelular particularizado de b) en una solución alcalina en concentraciones de ECM particularizada respecto a NaOH de entre un 0,1% y un 20% a 4°C para formar un gel;
- 20 d) neutralizar el gel del paso c) añadiendo un ácido; y
e) someter el gel del paso d) a un período de reposo de 1-48 horas, 12-36 horas, o 36-48 horas, o de unos pocos días, por ejemplo 3-7 días, en una habitación fría o a temperatura ambiente.
- 25 **2.** El método de la reivindicación 1, que además incluye:
- 30 f) congelar el gel neutralizado después de que el gel neutralizado se haya sometido al mencionado período de reposo del paso e); y
g) liofilizar el material congelado que se ha preparado en el paso f).
- 35 **3.** El método de la reivindicación 2, que además incluye reconstituir el gel liofilizado en una solución acuosa.
- 4.** El método de la reivindicación 1, de manera que el período de tiempo del paso c) se selecciona de un grupo que incluye de 30 minutos a 48 horas y de 3 a 7 días.
- 40 **5.** El método de la reivindicación 1, de manera que el mencionado material de matriz extracelular particularizado tiene unas partículas con un tamaño de entre 1 µm y 1000 µm.
- 6.** El método de la reivindicación 1, de manera que el mencionado material de matriz extracelular se solubiliza en concentraciones de entre un 0,5% y un 11% p/v de material de matriz extracelular particularizado en NaOH con un rango o intervalo molar de entre 0,1 M y 1,0 M.
- 45 **7.** El método de la reivindicación 1, de manera que el mencionado material de matriz extracelular solubilizado se neutraliza en ácido clorhídrico.
- 50 **8.** El método de la reivindicación 7, de manera que el mencionado ácido clorhídrico comprende concentraciones de entre 0,1 M y 1,0 M.
- 9.** El método de la reivindicación 1, de manera que los mencionados componentes bioactivos se seleccionan de un grupo que incluye FGF-2, CTGF y VEGF.
- 55 **10.** El método de la reivindicación 9, de manera que la concentración del mencionado FGF-2 en el mencionado material de matriz extracelular solubilizado es mayor cuando el mencionado material de matriz extracelular se solubiliza en NaOH de 1,0 M en comparación con el NaOH de 100 mM cuando la mencionada matriz extracelular se solubiliza durante más de 2 horas.
- 11.** El método de la reivindicación 9, de manera que la concentración del mencionado VEGF en el mencionado material de matriz extracelular solubilizado es mayor cuando el mencionado material de matriz extracelular se solubiliza en NaOH de 1,0 M en comparación con el NaOH de 100 mM cuando el mencionado material de matriz extracelular se solubiliza durante más de 2 horas.
- 60 **12.** El método de la reivindicación 1, de manera que el mencionado material de matriz extracelular particularizado comprende UBM (o matriz de la vejiga urinaria), y de manera que la mencionada UBM se solubiliza en concentraciones de un 7% de UBM particularizada en NaOH de 100 mM a 4° C durante 24 horas.
- 65 **13.** El método de la reivindicación 1, de manera que el mencionado material particularizado del paso b) tiene entre 200 y 700 micras.

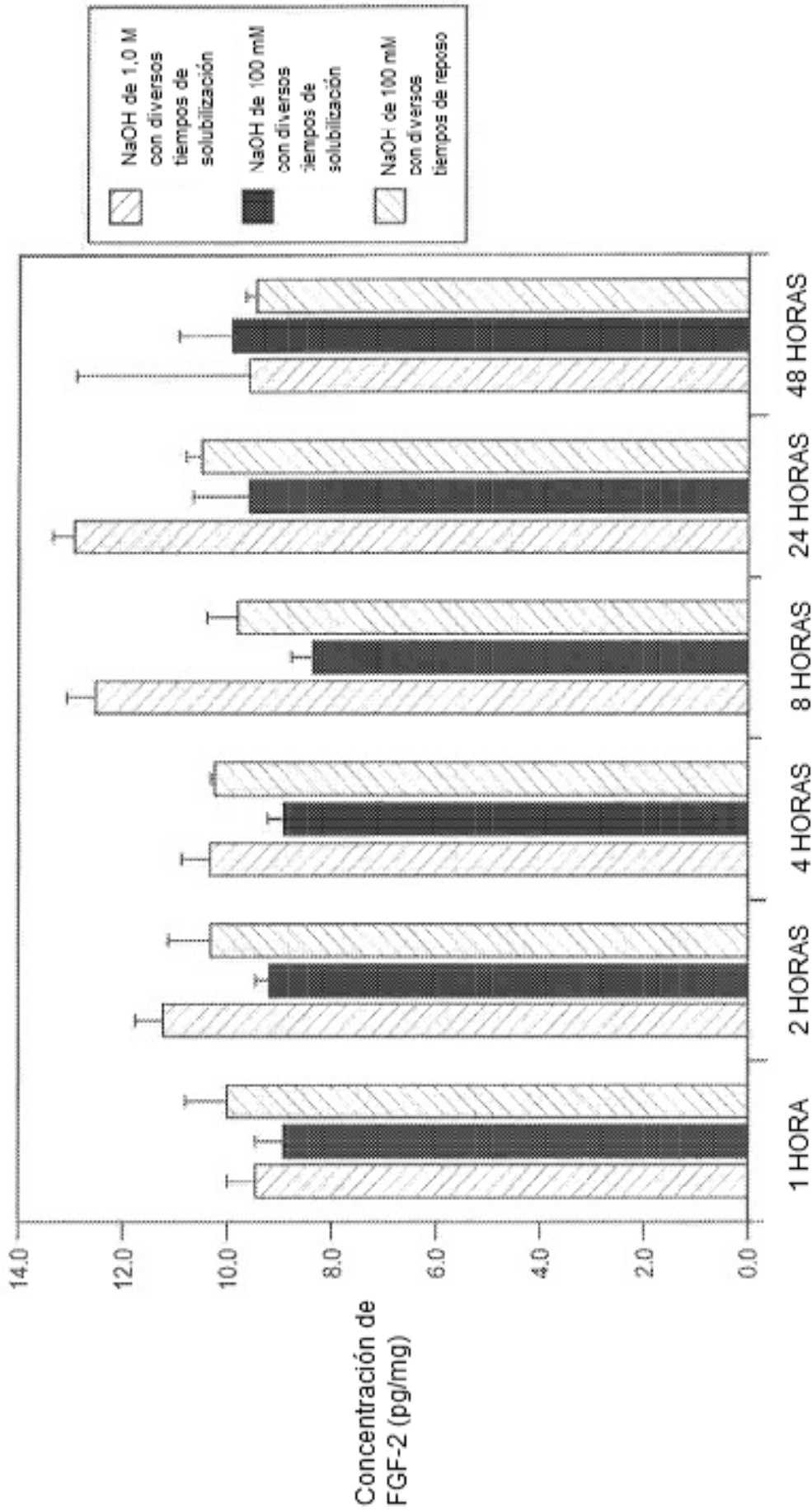


FIG. 1

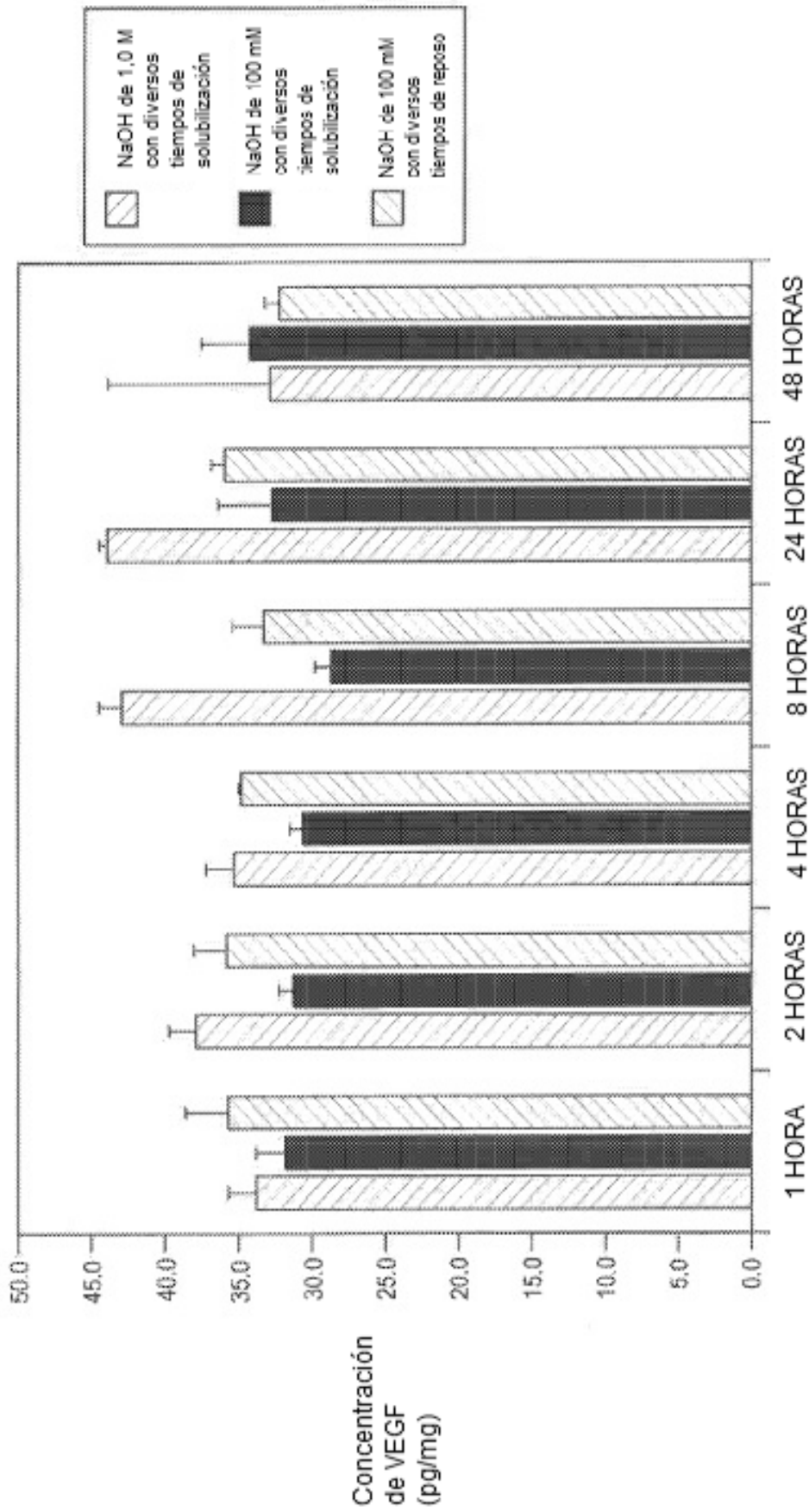


FIG. 2