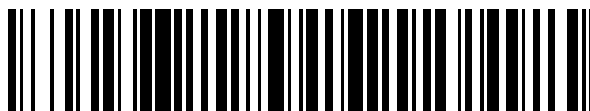


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 784 156**

51 Int. Cl.:

A61L 27/56 (2006.01)

A61L 27/58 (2006.01)

A61L 27/38 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.11.2012 PCT/US2012/064103**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.05.2013 WO13070881**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.11.2012 E 12791370 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2020 EP 2776082**

54 Título: **Método para la eliminación del espacio a través de la aproximación de tejidos**

30 Prioridad:

10.11.2011 US 201161558083 P

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

22.09.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**OWENS, RICK;
XU, HUI y
SUN, WENQUAN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 784 156 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

Método para la eliminación del espacio a través de la aproximación de tejidos

5 La presente descripción se refiere generalmente a las composiciones y métodos para la reparación, regeneración y/o tratamiento de tejido dañado o defectuoso. En particular, se describen composiciones y métodos para aproximar el tejido después de procedimientos quirúrgicos que dan como resultado la separación del tejido o de cualquier otra manera crean espacio entre los planos tisulares. Esta separación de tejidos puede dar lugar a la formación de seromas y/o hematomas indeseables.

10 El documento WO 2010/019753 A2 describe dispositivos para tratar heridas y métodos para tratar heridas mediante el uso de andamios tisulares. V.K. Deepak y otros, 2011 describe el efecto del manejo de incisiones cerradas con terapia de heridas de presión negativa en la formación de hematomas/seroma.

15 Los seromas y los hematomas son complicaciones comunes asociadas con muchos procedimientos quirúrgicos. Un seroma es una bolsa de fluido seroso transparente o amarillo que se origina en las glándulas serosas. Un hematoma, por el contrario, es una acumulación de sangre localizada fuera de un vaso sanguíneo. Ambos pueden resultar de un traumatismo, tal como un golpe o una caída, así como también de enfermedades o procedimientos quirúrgicos. Los seromas y los hematomas son comunes después de la cirugía plástica, particularmente para la cirugía en el área de la cabeza/cuello, así como también después de la cirugía abdominal.

20 La formación de seromas y hematomas después de la cirugía puede dificultar el proceso de recuperación. Si bien los seromas y los hematomas a menudo se resuelven sin intervención, algunos pacientes requieren visitas de seguimiento repetidas para drenarlos o tratarlos de cualquier otra manera. Además, la hinchazón causada por los seromas y los hematomas no siempre desaparece por completo, lo que lleva a la formación de un nudo antiestético de tejido calcificado que puede requerir una intervención quirúrgica adicional.

25 El tratamiento actual para seromas y hematomas consiste principalmente en el uso de drenajes para eliminar fluidos y la posterior reducción del espacio muerto. Estos tratamientos de drenaje dependen de la acción pasiva de los drenajes, que a menudo se dejan en su lugar durante largos períodos de tiempo, de manera que requieren atención médica prolongada y aumentan el riesgo de infección. Los enfoques de investigación alternativos para eliminar el espacio incluyen el uso de pegamentos u otros adhesivos para unir planos tisulares y reducir de esta manera el espacio abierto disponible para la acumulación de fluidos. Sin embargo, estas alternativas siguen siendo experimentales. Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de métodos alternativos para promover la adhesión natural del tejido y para eliminar la acumulación de fluidos dentro del espacio abierto entre los planos tisulares separados.

30 En consecuencia, se describen en la presente descripción composiciones de matriz de tejido acelular, métodos de preparación de las composiciones y métodos de uso de las composiciones para tratar o mejorar de cualquier otra manera las complicaciones asociadas con el tejido separado resultante de una enfermedad, trauma o cirugía. La invención está definida por las reivindicaciones.

35 En diversas modalidades, se proporciona un método para aproximar el tejido separado, el método que comprende implantar en un espacio entre dos o más planos tisulares separados de una matriz de tejido acelular, en donde la matriz de tejido acelular comprende la matriz extracelular de un tejido descelularizado. En algunas modalidades, la matriz de tejido acelular implantada comprende fragmentos de tejido acelular en partículas, o una espuma, película u otro material poroso capaz de soportar la migración y la proliferación de células del tejido circundante después de la implantación. En ciertas modalidades, implantar la matriz de tejido acelular evita la formación de un seroma o hematoma dentro del espacio entre los planos tisulares separados. En algunas modalidades, implantar la matriz de tejido acelular promueve una aproximación más rápida de los planos tisulares separados, en comparación con la aproximación de tejidos en ausencia de una matriz de tejido acelular implantada.

40 En diversas modalidades, la matriz de tejido acelular implantada comprende además al menos una malla biológica o no biológica. En algunas modalidades, la matriz extracelular del tejido descelularizado se superpone al menos a una porción de una superficie de la malla. En otras modalidades, la malla se superpone al menos a una porción de una superficie de la matriz extracelular del tejido descelularizado.

45 En algunas modalidades, la matriz de tejido acelular implantada comprende además una o más células viables que son histocompatibles con el paciente en el que se van a implantar. En ciertas modalidades, las células histocompatibles son células de mamífero. En una modalidad, la una o más células viables son células madre. En algunas modalidades, la matriz de tejido acelular implantada comprende además al menos un factor adicional seleccionado de un factor de crecimiento celular, un factor angiogénico, un factor de diferenciación, una citocina, una hormona y una quimiocina. En ciertas modalidades, el al menos un factor adicional está codificado por una secuencia de ácido nucleico contenida dentro de un vector de expresión. En una modalidad, el vector de expresión está contenido dentro de una o más células viables que son histocompatibles con el paciente en el que se van a implantar.

50

- 5 En diversas modalidades, la matriz de tejido acelular implantada se asegura a los planos tisulares circundantes. La matriz de tejido acelular implantada se puede asegurar a los planos tisulares circundantes mediante el uso de suturas biodegradables, presión externa positiva a los planos tisulares que rodean la matriz de tejido acelular implantada, o a través de un dispositivo de terapia de presión reducida. En algunas modalidades, la presión externa positiva comprende un apósito o unión alrededor de los planos tisulares. En otras modalidades, el dispositivo de terapia de presión reducida comprende una fuente de presión negativa que está conectada de manera fluida por un conducto o tubo de fluido a la matriz de tejido acelular y en donde el dispositivo de terapia de presión reducida suministra presión interna negativa a la matriz de tejido acelular.
- 10 En algunas modalidades, el dispositivo de terapia de presión reducida comprende además un colector poroso que se coloca en o cerca de la matriz de tejido acelular implantada, se conecta a la fuente de presión negativa por el conducto o tubo de fluido, y distribuye presión negativa dentro o cerca de la matriz de tejido acelular implantada. En algunas modalidades, la fuente de presión negativa es una bomba. En ciertas modalidades, el dispositivo de terapia de presión reducida comprende además un paño para sellar un sitio donde se ha implantado una matriz de tejido acelular.
- 15 En una modalidad, el paño está compuesto de un material polimérico flexible. En otra modalidad, el paño es de un grosor suficiente para permitir una terapia de presión reducida debajo del paño. En ciertas modalidades, se aplica un adhesivo al paño para sellar el paño al sitio donde se ha implantado una matriz de tejido acelular.
- 20 En diversas modalidades, se proporciona una matriz de tejido acelular como se describe en la presente descripción para usar en un método de tratamiento a un paciente que necesita aproximación de tejidos, que comprende implantar en un espacio entre dos o más planos tisulares separados una matriz de tejido acelular, en donde la matriz de tejido acelular comprende la matriz extracelular de un tejido descelularizado. En algunas modalidades, la matriz de tejido acelular implantada comprende fragmentos de tejido acelular en partículas, o una espuma, película u otro material poroso capaz de soportar la migración y proliferación de células desde los planos tisulares separados después de la implantación.
- 25 En algunas modalidades, implantar la matriz de tejido acelular evita la formación de un seroma o hematoma dentro del espacio entre los planos tisulares separados. En ciertas modalidades, la implantación de la matriz de tejido acelular promueve una aproximación más rápida de los planos tisulares separados, en comparación con la aproximación de tejidos en ausencia de una matriz de tejido acelular implantada. En diversas modalidades, la matriz de tejido acelular implantada se asegura a los planos tisulares circundantes. La matriz de tejido acelular implantada se puede asegurar a los planos tisulares circundantes mediante el uso de suturas biodegradables, presión externa positiva a los planos tisulares que rodean la matriz de tejido acelular implantada, o a través de un dispositivo de terapia de presión reducida.
- 30 En diversas modalidades, se proporciona un kit para su uso en el tratamiento a un paciente que necesita aproximación de tejidos, que comprende una matriz de tejido acelular e instrucciones para usar la matriz de tejido acelular al implantar la matriz de tejido acelular entre los planos tisulares separados. En algunas modalidades, el kit puede comprender además un dispositivo de terapia de presión reducida.
- 35 Descripción de los dibujos
- 40 Las Figuras 1A-B son fotos de matrices de tejido acelular de espuma preparadas a partir de dermis humana de acuerdo con ciertas modalidades de los métodos descritos en la presente descripción. La espuma en la Figura 1A se ha reticulado adicionalmente con EDAC, mientras que las espumas en las Figuras 1B y 1C no lo han hecho.
- 45 La Figura 2 ilustra un dispositivo de terapia de presión reducida para el suministro de presión reducida o negativa a una matriz de tejido acelular implantada, de acuerdo con ciertas modalidades descritas en la presente descripción.
- 50 La Figura 3 muestra gráficos de termogramas para matrices de tejido acelular de espuma porcina que se han sometido a tratamiento deshidrotérmico, así como también para matrices de tejido acelular de espuma porcina que no se han sometido a tratamiento deshidrotérmico, de acuerdo con ciertas modalidades descritas en la presente descripción.
- 55 La Figura 4 muestra la degradación del tejido a lo largo del tiempo para matrices de tejido acelular de espuma porcina tratadas con colagenasa tipo I a 37 °C, según se prepara de acuerdo con ciertas modalidades descritas en la presente descripción.
- 60 La Figura 5 ilustra un procedimiento de acuerdo con ciertas modalidades para plegar las matrices de tejido acelular de espuma porcina antes de la implantación subcutánea en ratas inmunocompetentes.
- 65 La Figura 6A-D muestra matrices de tejido acelular de espuma porcina explantada después de una implantación de 4 semanas en ratas inmunocompetentes. La Figura 6A muestra la apariencia macroscópica de las espumas de tejido explantadas. La Figura 6B muestra la vista en sección transversal de espumas de tejido explantadas. La Figura 6C muestra la tinción con H&E de espumas de tejido explantadas. La Figura 6D muestra la tinción con H&E de espumas de tejido explantadas a un aumento mayor. Las flechas indican la revascularización.
- Descripción de modalidades ilustrativas

Ahora se hará referencia en detalle a ciertas modalidades ilustrativas de acuerdo con la presente descripción, ciertos ejemplos de los cuales se ilustran en los dibujos adjuntos.

5 En esta solicitud, el uso del singular incluye el plural a menos que se indique específicamente de cualquier otra manera. También en esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique de cualquier otra manera. Además, el uso del término "que incluye", así como otras formas, como "incluye" e "incluido", no son limitantes. Se entenderá que cualquier rango descrito en la presente descripción incluye los puntos finales y todos los valores entre los puntos finales.

10 Los títulos de las secciones son solo para fines organizativos y no deben interpretarse como limitantes de la materia descrita. Se describen composiciones de matriz de tejido acelular y métodos para preparar y usar las composiciones. Las composiciones se pueden usar para aproximar el tejido, reduciendo de esta manera el espacio entre los planos tisulares dentro del cual se puede acumular fluidos o sangre. Como se usa en la presente descripción, "aproximación de tejidos" significa llenar, sellar o de cualquier otra manera eliminar o reducir el espacio entre los planos tisulares. El
15 término abarca todas las composiciones y métodos que producen, promueven o de cualquier otra manera mejoran el sellado natural o artificial de los planos tisulares que se han separado por daños o enfermedades.

Implantar matrices de tejido acelular para reducir el espacio entre los planos tisulares puede ayudar a prevenir la formación de seroma/hematoma. La implantación de las composiciones también puede promover la migración y
20 proliferación de células nativas desde los planos tisulares circundantes hacia la matriz de tejido acelular. Como resultado, la adhesión natural del tejido puede mejorarse a medida que las células de los planos tisulares separados u otro tejido (por ejemplo, sangre) ingresan y proliferan dentro de la matriz de tejido acelular. Como se usa en la presente descripción, los términos "células nativas" y "tejido nativo" significan las células o el tejido presentes en el
25 órgano o tejido del receptor antes de la implantación de una composición de matriz de tejido acelular.

Los materiales y métodos proporcionados en la presente descripción pueden usarse para hacer un implante de tejido biocompatible para usar en la aproximación de tejidos separado. Como se usa en la presente descripción, una
30 composición "biocompatible" es aquella que tiene la capacidad de soportar la actividad celular necesaria para la regeneración, reparación o tratamiento del tejido y no provoca una respuesta inmunitaria sustancial que evite tal actividad celular. Como se usa en la presente descripción, una "respuesta inmunitaria sustancial" es aquella que impide la regeneración, reparación o tratamiento parcial o completo del tejido.

Composiciones de matriz de tejido acelular

35 En la presente descripción se describen composiciones de matriz de tejido acelular para su uso en aproximación de tejidos. Como se usa en la presente descripción, los términos "matriz de tejido acelular" o "composición de matriz de tejido acelular" significan una composición que comprende un tejido descelularizado que es adecuado para usar para rellenar, sellar o eliminar o reducir el espacio entre los planos tisulares (es decir, adecuado para usar en aproximación
40 tisular) sin provocar una respuesta inmunitaria sustancial. En ciertas modalidades, la matriz de tejido acelular está completa o sustancialmente libre de todas las células presentes en el tejido antes de la descelularización. Como se usa en la presente descripción, "sustancialmente libre de todas las células" significa que la matriz de tejido acelular contiene menos del 20 %, 10 %, 5 %, 1 %, 0,1 %, 0,01 %, 0,001 % o 0,0001 % (o cualquier porcentaje entre) de las células que normalmente crecen dentro de la matriz acelular del tejido antes de la descelularización.

45 En diversas modalidades, la matriz de tejido acelular comprende al menos una porción de una matriz extracelular de un tejido descelularizado. El tejido acelular dentro de la composición puede estar en forma particulada o no particulada. En ciertas modalidades, la matriz de tejido acelular se proporciona en una espuma, película u otra forma porosa capaz de proporcionar un armazón estructural para la migración/proliferación de células nativas y que también es adecuada para la implantación entre los planos tisulares separados. A continuación, se describen métodos ilustrativos para
50 preparar estas matrices de tejido acelular.

Las matrices de tejido acelular descritas pueden proporcionar estructuras de tejido natural dentro de las cuales las células nativas y la vasculatura del tejido circundante pueden migrar y proliferar. La migración celular desde el tejido circundante hacia la matriz de tejido acelular puede dar como resultado un sellado o adhesión natural mejorado de
55 planos tisulares separados. Los métodos para usar matrices de tejido acelular para aproximar tejido se describen con más detalle a continuación.

Las matrices de tejido acelular descritas pueden derivarse de diversas fuentes de órganos o tejidos. Las matrices de tejido acelular proporcionan materiales esponjosos y flexibles después de la descelularización. En ciertas modalidades, este relleno de tejido esponjoso se puede moldear en las formas deseadas para encajar y/o llenar el espacio entre los
60 planos tisulares separados. En algunas modalidades, la matriz de tejido acelular retiene una elasticidad sustancial. Por ejemplo, si la matriz de tejido acelular se deriva de la dermis, entonces puede tener al menos la elasticidad de la dermis no descelularizada, si no aumenta la elasticidad. Esta elasticidad permite que una matriz de tejido acelular implantada se flexione, estire o comprima dentro de un sitio de implantación, lo que ayuda a mantener un marco de colágeno intacto durante un período de tiempo más largo.
65

En diversas modalidades, las matrices de tejido acelular son capaces de estiramiento, torsión o compresión sustanciales. Por ejemplo, las matrices de tejido pueden comprimirse hasta aproximadamente 2/3 de su longitud o anchura inicial. En otras modalidades adicionales, una matriz de tejido acelular es capaz de volver rápidamente a sus dimensiones originales después de la liberación de la compresión.

5 El armazón extracelular dentro de una matriz de tejido acelular puede consistir en colágeno, elastina u otras fibras, así como proteoglicanos, polisacáridos y factores de crecimiento. Una matriz de tejido acelular puede retener algunos o todos los componentes de la matriz extracelular que se encuentran naturalmente en un tejido antes de la descclularización, o varios componentes indeseables pueden eliminarse por medios químicos, enzimáticos o genéticos. En general, la matriz acelular proporciona una red estructural de fibras, proteoglicanos, polisacáridos y factores de crecimiento en los que el tejido y la vasculatura nativos pueden migrar, crecer y proliferar. Los componentes estructurales exactos de la matriz extracelular dependerán del tejido seleccionado y de los procesos utilizados para preparar el tejido acelular. Las composiciones de matriz de tejido acelular para su uso en aproximación de tejidos pueden derivarse de diversas fuentes de órganos o tejidos. Se pueden seleccionar órganos que tengan una forma tridimensional compacta, que incluyen órganos como pulmón, hígado, vejiga, músculo, grasa o dermis, que proporcionan una matriz acelular esponjosa después de la descclularización. Este tejido esponjoso puede procesarse o moldearse adicionalmente en una forma deseada para llenar parcial o completamente el espacio entre las capas de tejido separadas. En algunas modalidades, las composiciones de matriz de tejido acelular se proporcionan como tiras o bolas. En otras modalidades, las composiciones se moldean en cualquier forma o tamaño que sea adecuado para usar en la aproximación de un tejido particular. Las matrices de tejido acelular pueden derivarse de diversas fuentes animales. En ciertas modalidades, el tejido acelular se prepara a partir de tejido de cadáver, vaca, caballo o cerdo humano.

25 En ciertas modalidades, las matrices de tejido acelular se procesan para carecer de ciertos antígenos indeseables. Por ejemplo, ciertos tejidos animales contienen epítomos de alfa-galactosa (a-gal) que se sabe que provocan reacciones en humanos. Por lo tanto, las matrices de tejido acelular producidas a partir de tejidos animales pueden producirse o procesarse para carecer de ciertos antígenos, tales como a-gal. En algunas modalidades, las matrices de tejido acelular carecen sustancialmente de todos los restos a-gal. La eliminación de los epítomos α -gal de un armazón de tejido natural puede disminuir la respuesta inmunitaria contra una composición de matriz de tejido acelular. U. Galili y otros, J. Biol. Chem. 263: 17755 (1988). Como los mamíferos no primates (por ejemplo, cerdos) producen epítomos α -gal, el xenotrasplante de material de matriz de tejido acelular de estos mamíferos a los primates puede provocar el rechazo debido a la unión de anti-Gal de primates a los epítomos α -gal en la matriz de tejido acelular. La unión da como resultado la destrucción de las matrices de tejido acelular por fijación del complemento y por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. U. Galili y otros, Immunology Today 14: 480 (1993); M. Sandrin y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 11391 (1993); H. Good y otros, Transplant. Proc. 24: 559 (1992); BH Collins y otros, J. Immunol. 154: 5500 (1995).

40 Como se describe en detalle a continuación, en diversas modalidades, las matrices de tejido acelular pueden procesarse para eliminar antígenos tales como α -gal, por ejemplo, mediante tratamiento químico o enzimático. Alternativamente, las matrices de tejido acelular pueden producirse a partir de animales que han sido modificados genéticamente para carecer de esos epítomos.

45 En diversas modalidades, las matrices de tejido acelular tienen una carga biológica reducida (es decir, un número reducido de microorganismos que crecen en las composiciones). En algunas modalidades, las matrices de tejido acelular carecen sustancialmente de toda carga biológica (es decir, las matrices de tejido acelular son asépticas o estériles). Como se usa en la presente descripción, "sustancialmente toda la carga biológica" significa matrices de tejido acelular en las que la concentración de microorganismos en crecimiento es inferior al 1 %, 0,1 %, 0,01 %, 0,001 % o 0,0001 % (o cualquier porcentaje intermedio) de ese crecimiento en no tratado matrices de tejido acelular.

50 En ciertas modalidades, una composición de matriz de tejido acelular puede comprender además uno o más agentes adicionales. En algunas modalidades, el agente adicional es una malla u otra estructura no biológica (pero biocompatible) que proporciona un armazón reforzado para la migración y proliferación de células nativas. Como se usa en la presente descripción, una "malla" es cualquier composición que comprende hebras tejidas o interconectadas de fibras sintéticas o biológicas. El tejido acelular puede superponer al menos una porción de una superficie de la malla o andamio, o viceversa.

60 En ciertas modalidades, una composición de matriz de tejido acelular puede comprender además uno o más agentes adicionales, en donde los agentes adicionales comprenden células madre u otras células viables que son histocompatibles con el paciente en el que se van a implantar. En algunas modalidades, las células histocompatibles son células de mamífero. Dichas células pueden promover la migración, proliferación y/o vascularización de tejidos nativos.

65 En algunas modalidades, el agente adicional comprende al menos un factor de crecimiento o señalización añadido (por ejemplo, un factor de crecimiento celular, un factor angiogénico, un factor de diferenciación, una citocina, una hormona y/o una quimiocina). Estos agentes adicionales pueden promover la migración, proliferación y/o vascularización de tejidos nativos. En algunas modalidades, el factor de crecimiento o señalización está codificado por

una secuencia de ácido nucleico contenida dentro de un vector de expresión. Preferiblemente, el vector de expresión está en una o más de las células viables que pueden incluirse, opcionalmente, junto con la matriz de tejido acelular. Como se usa en la presente descripción, el término "vector de expresión" se refiere a cualquier construcción de ácido nucleico que es capaz de ser absorbida por una célula, contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína deseada y contiene las otras secuencias de ácido nucleico necesarias (por ejemplo, promotores, potenciadores, codón de terminación, etc.) para asegurar al menos una expresión mínima de la proteína deseada por la célula.

Las composiciones de matriz de tejido acelular pueden comprender además componentes sintéticos o naturales adicionales, siempre que estos componentes promuevan la migración y/o proliferación celular natural. Por ejemplo, las composiciones de matriz de tejido acelular pueden contener mallas sintéticas u otras estructuras que mejoran la matriz de tejido acelular y, por lo tanto, promueven el crecimiento de células nativas. En algunas modalidades, se pueden usar mallas sintéticas que rodean o subyacen una matriz de tejido acelular para reforzar la matriz acelular. El refuerzo puede permitir que la matriz de tejido acelular proporcione un armazón estructural para la migración de células nativas durante un período de tiempo más largo.

Métodos de producción

Las composiciones de matriz de tejido acelular que se usan para aproximar el tejido pueden prepararse de acuerdo con diversos métodos. En algunas modalidades, el tejido se descelulariza y, opcionalmente, se procesa adicionalmente para producir una espuma, película u otra estructura porosa que puede servir como armazón de tejido acelular para la migración y proliferación de células nativas.

Se puede preparar una matriz de tejido acelular a partir de cualquier tejido que sea adecuado para la descelularización y posterior implantación para aproximación de tejidos. Se pueden usar órganos que tienen una forma tridimensional compacta, que incluyen órganos como pulmón, hígado, vejiga, músculo, grasa o dermis, ya que proporcionan una matriz acelular esponjosa después de la descelularización. En ciertas modalidades ilustrativas, la matriz de tejido acelular comprende ALLODERM® o STRATTICE™, que son productos dérmicos humanos y porcinos dérmicos acelulares, respectivamente, y están disponibles en LifeCell Corporation (Branchburg, NJ).

El tejido descelularizado en una matriz de tejido acelular puede tratarse para volverlo aséptico o estéril. En algunas modalidades, el tejido puede tratarse adicionalmente para eliminar contaminantes, esterilizar el tejido o eliminar ciertos antígenos indeseables.

Los métodos ilustrativos para descelularizar tejido y/o fragmentar tejido descelularizado para producir tejido acelular en partículas se describen en la patente de Estados Unidos 6,933,326 y la solicitud de Patente de Estados Unidos 2010/0272782. El tejido acelular particulado abarca cualquier fragmento de tejido generalmente esférico o de forma irregular que tenga una dimensión más larga de menos de aproximadamente 5.000 micras. El tejido acelular particulado puede hacerse a partir de cualquiera de los tejidos acelulares no particulados descritos en la presente descripción. Por ejemplo, el tejido acelular en partículas se puede preparar fragmentando el tejido no en partículas antes o después de la descelularización. Por ejemplo, el tejido no particulado se puede cortar en tiras, por ejemplo, mediante el uso de una malla Zimmer, después las tiras se pueden cortar para formar pequeños fragmentos de menos de 5.000 micras de tamaño. Los pequeños fragmentos ilustrativos se pueden homogeneizar adicionalmente mediante el uso de un homogeneizador para producir pequeños fragmentos del tamaño deseado. En algunas modalidades, el tejido particulado descelularizado puede procesarse adicionalmente para producir una espuma, película u otra estructura porosa que proporciona un armazón estructural en el que las células del tejido nativo circundante pueden migrar y proliferar.

En ciertas modalidades, la matriz de tejido acelular se prepara como una película. Como se usa en la presente descripción, el término "película" significa cualquier lámina o recubrimiento de colágeno que contiene una matriz de tejido extracelular que se forma hinchando fragmentos de tejido acelular y después secando la suspensión en un molde para formar una película de forma deseada. En algunas modalidades, se prepara una película como se describe en la solicitud de Estados Unidos 2010/0272782.

En ciertas modalidades, la matriz de tejido acelular se prepara como una espuma porosa. Como se usa en la presente descripción, el término "espuma" significa cualquier material de colágeno poroso que contenga una matriz de tejido extracelular que se forma mediante la formación de una suspensión de fragmentos de tejido acelular y después liofilizando la suspensión en un molde para formar una espuma de forma deseada. En algunas modalidades, se prepara una espuma como se describe en la solicitud de Estados Unidos 2010/0272782.

En algunas modalidades, se prepara una composición de matriz de tejido acelular particulado micronizando, criofracturando, homogeneizando (por ejemplo, a través de un mezclador, molino de bolas, homogeneizador ultrasónico o cualquier otro homogeneizador) o fragmentando de cualquier otra manera el tejido descelularizado. El tejido acelular fragmentado puede estar en forma de partículas, fibras, hilos u otros fragmentos. Los métodos ilustrativos de fragmentación de tejido descelularizado se describen en la patente de Estados Unidos 6,933,326 y la solicitud de patente de Estados Unidos 2010/0272782. En algunas modalidades, el tejido acelular fragmentado se

puede colocar después en una solución ácida para crear una suspensión homogénea de tejido acelular hinchado. Antes de hinchar el tejido fragmentado, la matriz de tejido acelular se puede lavar para eliminar cualquier crioprotector residual u otros contaminantes. Las soluciones usadas para el lavado pueden ser cualquier solución fisiológicamente compatible. Los ejemplos de soluciones de lavado adecuadas incluyen agua destilada, solución salina tamponada con fosfato (PBS) o cualquier otra solución salina biocompatible.

El ácido utilizado para hinchar los fragmentos de tejido acelular puede ser cualquier ácido que mantenga los fragmentos como una suspensión homogénea y no dé como resultado una desnaturalización sustancial e irreversible de las fibras de colágeno en los fragmentos de tejido. Como se usa en la presente descripción, el término "suspensión homogénea" es una suspensión en la que los fragmentos de tejido acelular no tienen más de 3 mm de diámetro (por ejemplo, no más de 3,0 mm, 2,5 mm, 2,0 mm, 1,5 mm, 1.000 μm , 900 μm , 800 μm , 700 μm , 600 μm o 500 μm de diámetro, o cualquier valor intermedio), y los fragmentos se distribuyen en un medio líquido. En algunas modalidades, la solución ácida utilizada para hinchar los fragmentos de tejido acelular tendrá un pH aproximadamente igual o inferior a 3,0 (por ejemplo, un pH igual o inferior a 3,2, 3,15, 3,5, 3,0, 2,95, 2,85, 2,8, 2,75, o cualquier valor intermedio). Los ejemplos de ácidos útiles incluyen ácido acético, ácido ascórbico, ácido bórico, ácido carbónico, ácido cítrico, ácido clorhídrico, ácido láctico, ácido peracético, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido tánico y ácido tricloroacético. También se pueden usar combinaciones de dos o más ácidos.

La concentración específica de ácido dependerá de la fuerza del ácido utilizado. Por ejemplo, si se selecciona ácido acético, el ácido podría usarse, en ciertas modalidades, a una concentración entre aproximadamente 25 mM y 250 mM (es decir, aproximadamente 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225 o 250 mM, o cualquier concentración intermedia). Otro ácido ilustrativo es el ácido clorhídrico (HCl). El HCl se puede usar, en ciertas modalidades, a una concentración entre aproximadamente 25 mM y 200 mM (por ejemplo, aproximadamente 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 o 200 mM, o cualquier valor intermedio). El término "aproximadamente", como se usa aquí, abarca cualquier concentración que varía de la concentración establecida en un 10 % o menos (es decir, una concentración de 50 mM abarca todas las concentraciones entre 45 mM y 55 mM).

Los fragmentos de tejido acelular pueden hincharse en ácido durante cualquier período de tiempo requerido para producir una suspensión homogénea de fragmentos de tejido acelular. Por ejemplo, la hinchazón puede ocurrir durante aproximadamente 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 9,0, 10, 11, 12, 14, 16, 18, 22, 24, 36 o 48 horas (o cualquier período de tiempo intermedio). El término "aproximadamente" abarca todos los tiempos que varían hasta 0,2 horas por encima o por debajo del tiempo establecido (es decir, un tiempo de hinchamiento de 2,0 horas abarca todos los tiempos de hinchamiento que varían de 1,8 horas a 2,2 horas).

En ciertas modalidades, la hinchazón se logra poniendo en contacto fragmentos de tejido acelular con una solución ácida a una temperatura ligeramente superior a la temperatura ambiente (por ejemplo, a una temperatura aproximada de 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 o 45 grados Celsius, o cualquier temperatura intermedia). El término "aproximadamente" incluye cualquier temperatura que varía en 0,5 °C (es decir, una temperatura de 30,0 °C incluye todas las temperaturas entre 29,5 °C y 30,5 °C).

El tipo de ácido, la concentración de ácido, la duración de la exposición al ácido y la temperatura utilizada durante la inflamación pueden ajustarse para lograr una inflamación óptima de los fragmentos de tejido acelular mientras se evita la desnaturalización del colágeno. Por ejemplo, el tejido acelular de diferentes fuentes animales puede requerir diferentes condiciones de hinchazón para lograr una inflamación óptima.

La concentración final de fragmentos de tejido acelular en la solución homogénea puede ser cualquier concentración en la que la hinchazón se produzca de manera uniforme y dé como resultado una suspensión homogénea. Por ejemplo, las concentraciones útiles (p/v) de fragmentos de matriz de tejido acelular en solución ácida pueden variar de aproximadamente 0,1 % a 4,0 % (por ejemplo, 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 1,0 %, 1,5 %, 2,0 %, 2,5 %, 3,0 %, 3,5 % o 4,0 %, o cualquier porcentaje intermedio). Como se usa aquí, el término "aproximadamente" abarca cualquier porcentaje que varía desde el porcentaje indicado hasta un 0,5 % (es decir, una solución del 2,0 % abarca todas las soluciones que tienen fragmentos de tejido acelular del 1,5 % al 2,5 %, medido p/v).

En ciertas modalidades, una vez que los fragmentos de tejido acelular se han hinchado en una solución ácida, la solución homogénea se aplica después a un molde de forma deseada y se deja secar para producir una película porosa. El secado puede realizarse por cualquier método conocido en la técnica que dará como resultado la retención de las propiedades biológicas y fisiológicas deseadas del tejido acelular, que incluyen, por ejemplo, la estructura de las fibras de colágeno y la estructura extracelular. Los métodos de secado ilustrativos incluyen secado al aire o secado bajo gas inerte (por ejemplo, nitrógeno o argón). La temperatura de secado puede ser la temperatura ambiente, por ejemplo, aproximadamente 25 °C. Como se usa aquí, "aproximadamente" significa cualquier temperatura dentro de un rango de 3 °C de la temperatura de secado establecida de 25 °C (es decir, 22,0 °C, 22,5 °C, 23,0 °C, 23,5 °C, 24,0 °C, 24,5 °C, 25,0 °C, 25,5 °C, 26,0 °C, 26,5 °C, 27,0 °C, 27,5 °C, 28,0 °C, o cualquier temperatura intermedia). Alternativamente, el secado se puede realizar a una temperatura que es moderadamente superior a la temperatura ambiente, por ejemplo, a una temperatura de aproximadamente 25 °C a 45 °C. Por ejemplo, el secado se puede realizar a aproximadamente 25 °C, 26 °C, 27 °C, 28 °C, 29 °C, 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C, 37 °C, 38 °C, 39 °C, 40 °C, 41 °C, 42 °C, 43 °C, 44 °C o 45 °C, o cualquier temperatura intermedia. Como se usa aquí,

"aproximadamente" significa cualquier temperatura dentro de 0,5 °C de la temperatura establecida (es decir, una temperatura de 40 °C incluye cualquier temperatura entre 39,5 °C y 40,5 °C). El secado puede emplear convección, conducción o cualquier otro método que transfiera calor a través del contacto directo o indirecto para secar la suspensión homogénea en el molde.

5 En modalidades alternativas, la solución homogénea descrita anteriormente se puede verter en un molde y liofilizar para producir una composición de espuma. Se describen métodos ilustrativos en la solicitud de patente de Estados Unidos 2010/0272782 y las patentes de Estados Unidos 5,364,756; 5,780,295; y 6,194,136. La liofilización implica la eliminación de agua y/u otros solventes de un producto congelado y se puede lograr mediante una variedad de
10 métodos, que incluyen los métodos múltiples, discontinuos o a granel. Las condiciones para la liofilización, que incluyen el tiempo, la velocidad de enfriamiento y la temperatura final, pueden variar en dependencia de la técnica de liofilización empleada.

15 En ciertas modalidades, las composiciones de espuma acelular pueden prepararse cortando o cortando tejido descelularizado en pequeños fragmentos y después homogeneizando los fragmentos. Como se usa aquí, "pequeño" significa aproximadamente 3 mm o menos de diámetro (por ejemplo, no más de 3,0 mm, 2,5 mm, 2,0 mm, 1,5 mm, 1.000 µm, 900 µm, 800 µm, 700 µm, 600 µm o 500 µm de diámetro, o cualquier valor intermedio). "Aproximadamente" en este contexto significa cualquier diámetro dentro de 0,5 mm del diámetro establecido (es decir, un fragmento de
20 1,0 mm incluye fragmentos que tienen un diámetro entre 0,5 mm y 1,5 mm). Los fragmentos se pueden homogeneizar, por ejemplo, mediante el uso de una licuadora, un molino de bolas, un homogeneizador ultrasónico o cualquier otro homogeneizador. En algunas modalidades, el tejido homogeneizado puede lavarse mediante el uso de cualquier solución de lavado adecuada (por ejemplo, agua destilada o PBS) y después suspenderse en una solución ácida como se describe anteriormente. Las suspensiones de tejido ácido pueden después colocarse en un molde de la forma deseada y liofilizarse (por ejemplo, mediante el uso de bolsas de liofilización Tyvek®). Las condiciones para la
25 liofilización, que incluyen el tiempo, la velocidad de enfriamiento y la temperatura, pueden variar en dependencia de la técnica de liofilización empleada.

En ciertas modalidades, las composiciones de espuma y película descritas anteriormente pueden estabilizarse adicionalmente mediante la reticulación química de las moléculas de colágeno entre sí o con varios otros materiales
30 biológicos o sintéticos (por ejemplo, reticulación con mallas sintéticas que proporcionan un soporte estructural mejorado para el tejido acelular). Los agentes de reticulación pueden incluir glutaraldehído, carbodiimidas (que incluyen hidrocloruro de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDAC)), bisdiazobencidina, éster de N-maleimidobenzil-N-hidroxisuccinimida y N-hidroxisulfosuccinimida (NHS). También es posible usar combinaciones de agentes de reticulación. Otros posibles agentes de reticulación y métodos de reticulación se describen en la Solicitud de Patente de Estados Unidos 2010/0272782. La Figura 1 muestra matrices de tejido acelular de espuma preparadas a partir de dermis humana (la espuma en la figura 1A se reticula mediante el uso de EDAC).

En algunas modalidades, la reticulación se logra mediante tratamiento deshidrotérmico (por ejemplo, curar una matriz de tejido acelular en un horno de calor en condiciones de vacío). En ciertas modalidades, el tratamiento deshidrotérmico se puede realizar a una temperatura entre aproximadamente 80 °C y 120 °C (por ejemplo, aproximadamente 80 °C, 85 °C, 90 °C, 95 °C, 100 °C, 105 °C, 110 °C, 115 °C o 120 °C, o cualquier temperatura intermedia). El término "aproximadamente" en este contexto significa cualquier temperatura dentro de los 2 °C de la temperatura establecida (es decir, una temperatura establecida de 100 °C abarca todas las temperaturas entre 98 °C
40 y 102 °C).

En ciertas modalidades, la reticulación se puede llevar a cabo hidratando una película o composición de espuma en una solución que contiene agente (s) de reticulación. Alternativamente, los reactivos de reticulación que son activos a pH ácido se pueden agregar directamente a la solución ácida que contiene fragmentos de tejido acelular hinchado. La duración de la reacción de reticulación puede variar dependiendo del reactivo de reticulación utilizado, la concentración de reticulante, el tipo de tejido acelular, la temperatura de reacción y el grado deseado de reticulación.
50

En algunas modalidades, las composiciones de matriz de tejido acelular para su uso en aproximación de tejidos pueden tratarse para reducir la carga biológica (es decir, para reducir el número de microorganismos que crecen en la composición). En algunas modalidades, las composiciones se tratan de manera que carecen sustancialmente de
55 toda carga biológica (es decir, las composiciones son asépticas o estériles). Como se usa en la presente descripción, "sustancialmente toda la carga biológica" significa que la concentración de microorganismos que crecen en la composición es inferior al 1 %, 0,1 %, 0,01 %, 0,001 % o 0,0001 % de la que crece en composiciones no tratadas, o cualquier porcentaje intermedio. Los expertos en la técnica conocen métodos adecuados de reducción de la carga biológica y pueden incluir irradiación. La irradiación puede reducir o eliminar sustancialmente la carga biológica. En algunas modalidades, se administra una dosis absorbida de 15-17 kGy de radiación de haz E para reducir o eliminar sustancialmente la carga biológica. Otros métodos de irradiación se describen en la solicitud de Estados Unidos 2010/0272782.
60

En modalidades adicionales, las composiciones de tejido acelular se tratan con alfa-galactosidasa para eliminar los restos alfa-galactosa (α-gal). En algunas modalidades, para eliminar enzimáticamente los epítomos α-gal, después de lavar el tejido a fondo con solución salina, el tejido puede someterse a uno o más tratamientos enzimáticos para
65

eliminar los antígenos α -gal, si están presentes en la muestra. En algunas modalidades, el tejido puede tratarse con una enzima α -galactosidasa para eliminar los epítomos α -gal. En modalidades adicionales, el tejido se trata con α -galactosidasa a una concentración de 0,2 U/ml preparada en solución salina tamponada con fosfato 100 mM a pH 6,0. En otras modalidades, la concentración de α -galactosidasa se reduce a 0,1 U/ml o aumenta a 0,3 o 0,4 U/ml (o cualquier valor intermedio). En otras modalidades, se puede usar cualquier concentración de enzima y tampón adecuados siempre que se logre una eliminación de antígeno suficiente. Además, ciertos métodos ilustrativos de procesamiento de tejidos para reducir o eliminar restos alfa-1,3-galactosa se describen en Xu y otros, Tissue Engineering, vol. 15, 1-13 (2009).

Alternativamente, en ciertas modalidades, los animales que se han modificado genéticamente para carecer de uno o más epítomos antigénicos pueden seleccionarse como la fuente de tejido para una composición de matriz de tejido acelular. Por ejemplo, los animales (por ejemplo, cerdos) que han sido modificados genéticamente para carecer del resto de α -galactosa terminal pueden seleccionarse como la fuente de tejido. Para obtener descripciones de los animales apropiados y los métodos para producir animales transgénicos para xenotrasplantes, consulte la Solicitud de Patente de Estados Unidos Número de Serie 10/896,594 y la Patente de Estados Unidos Núm. 6,166,288.

Métodos de uso

Un desafío importante después de la cirugía u otra enfermedad/trauma tisular es la formación de seromas o hematomas dentro del espacio creado entre los planos tisulares. Las terapias actuales implican el uso de drenajes para eliminar el fluido del espacio entre los planos de los tejidos mediante drenaje pasivo. Tal drenaje puede requerir atención médica prolongada mientras que potencialmente no puede eliminar el espacio entre los planos tisulares. Todavía se están desarrollando alternativas propuestas que involucran pegamentos para cerrar artificialmente el espacio entre los tejidos. Por lo tanto, se necesitan varias soluciones alternativas para la aproximación de tejidos. En ciertas modalidades, las matrices de tejido acelular descritas anteriormente se usan para rellenar el espacio entre los planos tisulares y/o para promover la aproximación de planos tisulares.

Como se usa en la presente descripción, el término "plano tisular" significa cualquier capa de tejido que se ha separado de otra capa de tejido a la que está normalmente unida, dando como resultado la formación de un espacio entre las capas de tejido. La separación puede ocurrir naturalmente, como a través de una enfermedad que conduce a la disociación de las capas de tejido, o puede ocurrir artificialmente a través de un trauma o intervención quirúrgica que resulta en la separación del tejido. Como se usa en la presente descripción, el término "espacio" significa la región entre dos o más planos tisulares separados que resulta de enfermedad, trauma o intervención quirúrgica. El espacio puede estar vacío o lleno de fluido u otro material. Se entenderá que el espacio puede formarse mediante la separación de planos tisulares naturales o límites del tejido natural. Por ejemplo, el espacio puede formarse en el límite entre dos tipos de tejidos diferentes (por ejemplo, entre un músculo y la fascia asociada, entre una membrana y vísceras asociadas, o entre un tendón y la vaina circundante, entre otros ejemplos). Alternativamente, el espacio puede formarse dentro de un solo tejido (por ejemplo, mediante disección quirúrgica dentro de la grasa para formar planos tisulares grasos separados). Además, se entenderá que los "planos tisulares", como se usan en la presente descripción, pueden ser planos, pero también pueden estar curvos o contorneados de acuerdo con la anatomía natural, o como resultado de una enfermedad, trauma o intervención quirúrgica.

En ciertas modalidades, después de la creación de espacio entre los planos tisulares como resultado de una enfermedad, trauma o intervención quirúrgica, se coloca una composición de matriz de tejido acelular (como se describió anteriormente) entre los planos tisulares separados. La matriz de tejido acelular se puede asegurar a los planos tisulares separados mediante el uso de cualquier método conocido que dé como resultado la asociación física temporal o permanente de la matriz de tejido acelular con los planos tisulares próximos. Por ejemplo, las suturas biodegradables se pueden usar para asegurar físicamente la matriz de tejido acelular a los planos tisulares separados.

Alternativamente, se puede aplicar presión positiva externa (por ejemplo, un apósito o unión alrededor de los planos tisulares separados) para comprimir los planos tisulares separados y de esta manera mantener los planos tisulares en contacto con la matriz de tejido acelular implantada.

En ciertas modalidades, se puede aplicar presión negativa interna dentro de la matriz de tejido acelular para asegurar el implante a los planos tisulares circundantes. La presión negativa interna puede tirar de los planos tisulares separados hacia la matriz de tejido acelular implantada y de esta manera mantener el contacto entre el implante y los planos tisulares circundantes. En algunas modalidades, la presión negativa interna también se puede utilizar para eliminar activamente el fluido o la sangre del espacio entre las capas de tejido separadas, reduciendo, tratando o evitando de esta manera la formación de seroma o hematoma. En ciertas modalidades, la presión negativa también puede servir para extraer células del tejido circundante hacia la matriz de tejido acelular implantada, aumentando la velocidad a la que las células nativas migran hacia la matriz de tejido y mejorando la velocidad y/o la eficacia general de la aproximación del tejido.

En ciertas modalidades ilustrativas, la presión negativa interna se suministra a la matriz de tejido acelular mediante un dispositivo de terapia de presión reducida. El dispositivo de terapia de presión reducida puede incluir una bomba conectada de manera fluida, por ejemplo, a través de un conducto o tubo de fluido a la matriz de tejido acelular, y que

suministra presión reducida o negativa a la matriz de tejido acelular. Se puede usar una variedad de dispositivos de terapia de presión reducida. Por ejemplo, los dispositivos de terapia de presión reducida adecuados incluyen dispositivos de terapia V.A.C.® producidos por KCI (San Antonio, Texas).

5 En algunas modalidades, los dispositivos de terapia de presión reducida pueden incluir una bomba de vacío, similar a la bomba 122 mostrada en la Figura 2. La bomba 122 se puede conectar de manera fluida, por ejemplo, a través de un conducto o tubo de fluido 124, a una matriz de tejido acelular 180 de manera que la presión negativa se distribuya dentro de la matriz de tejido acelular implantada. La naturaleza porosa de la matriz de tejido acelular 180 le permite canalizar la presión negativa y/o eliminar el fluido del sitio del implante 150. Tales dispositivos también pueden incluir
10 una lámina flexible, un paño o un apósito 160 para cubrir el sitio donde se implanta la matriz de tejido acelular 150 y sellar al menos parcialmente el sitio para que la presión reducida pueda proporcionarse en el sitio de implantación 150 por el dispositivo de presión reducida 120.

En ciertas modalidades del dispositivo de presión reducida, se puede usar un colector poroso opcional para distribuir de manera más uniforme la presión negativa dentro de la matriz de tejido acelular. En algunas modalidades, el colector está unido al extremo del conducto o tubo de fluido y se coloca dentro o cerca de la matriz de tejido acelular. En algunas modalidades, el colector es una estructura polimérica porosa capaz de canalizar la presión negativa de manera uniforme a lo largo de una matriz de tejido acelular o a través de un sitio de implante de tejido. El colector puede fabricarse a partir de una variedad de materiales adecuados. Por ejemplo, hay varios materiales diferentes disponibles para usar como colectores con los sistemas de tratamiento V.A.C.® mencionados anteriormente. Tales
15 materiales pueden incluir estructuras de espuma polimérica de células abiertas porosas, tales como los poliuretanos de células abiertas (tal como VAC® GRANUFOAM® Dressing, KCI, San Antonio, Texas). En diversas modalidades, el colector específico usado puede seleccionarse en base al sitio particular donde se implanta la matriz de tejido acelular.

25 En algunas modalidades, el sistema de presión reducida incluirá un adhesivo que puede facilitar la unión de la lámina flexible 160 al tejido u otros componentes del sistema de presión negativa. Como se usa aquí, "adhesivo" se refiere a cualquier sustancia que hace que las superficies de dos objetos se unan entre sí. En diversas modalidades, los adhesivos adecuados pueden incluir una variedad de cementos, pegamentos, resinas u otros materiales diferentes que pueden facilitar la unión de la lámina flexible 160 al tejido u otros componentes del sistema de presión negativa.

30 En algunas modalidades, el adhesivo puede incluir un adhesivo acrílico sensible a la presión. En diversas modalidades, los adhesivos se pueden aplicar directamente a las estructuras a unir, o los adhesivos se pueden aplicar a cinta, o con otros materiales de sustrato de soporte.

En algunas modalidades, el adhesivo se puede aplicar a una superficie de la lámina flexible 160 para unir la lámina a la piel u otro tejido que rodea el sitio de una matriz de tejido acelular implantada. En algunas modalidades, el adhesivo se aplicará a la superficie de la lámina 160 y se empaquetará y/o distribuirá con la lámina 160. En algunas modalidades, el adhesivo se aplica a una superficie de la lámina 160 y se cubre con un material no adhesivo que puede retirarse para exponer el adhesivo para su uso. En ciertas modalidades, el adhesivo se puede suministrar como un componente separado (por ejemplo, en un recipiente o en una cinta) que se aplica a la lámina 160 para unir la lámina 160 al tejido.
35

40 En algunas modalidades, se proporciona un método para aplicar presión reducida a una matriz de tejido acelular implantada para mejorar la aproximación de tejidos. En ciertas modalidades, se aplica presión reducida o negativa a una matriz de tejido acelular implantada mediante el uso de un dispositivo de terapia de presión reducida tal como el dispositivo que se muestra en la Figura 2. En ciertas modalidades, la matriz de tejido acelular 180 se coloca entre los planos tisulares separados. A continuación, la matriz de tejido acelular 180 se acopla de manera fluida al dispositivo de presión reducida 122 por un conducto o tubo de fluido 124. Luego, después que se posiciona el sistema de presión negativa 120, la lámina flexible 160 se une sobre el sitio del implante 150, con los bordes de la lámina 160 superpuestos a los márgenes del sitio del implante 150 una distancia suficiente para permitir que se forme un sello. Se entenderá que el ejemplo anterior es solo una modalidad del sistema de presión reducida y se contemplan variaciones dentro de la presente descripción. Por ejemplo, en algunas modalidades donde los tejidos separados son internos al cuerpo o donde los tejidos separados se sellan mediante el uso de suturas (u otras técnicas adecuadas), puede no ser necesario un paño para liberar presión negativa. De manera similar, en ciertas modalidades donde se desea una distribución más uniforme de la presión negativa, se puede usar un colector polimérico poroso para suministrar presión negativa en o cerca de la matriz de tejido acelular implantada.
45
50

55 En ciertas modalidades, se implanta una matriz de tejido acelular para aproximar el tejido que se separa debido a la intervención quirúrgica. La separación quirúrgica de los planos tisulares puede ocurrir dentro de varios tejidos, y se puede usar una matriz de tejido acelular para aproximar cualquiera de estos tejidos. En ciertas modalidades, el tejido que va a tratarse es tejido mamario, donde se crea espacio (en riesgo de formación de seroma/hematoma) después de varios tipos de cirugía mamaria (por ejemplo, cirugías o mastectomías mamarias cosméticas). En otras modalidades, el seroma o hematoma que va a tratarse es el resultado de una cirugía plástica o cosmética (por ejemplo, estiramiento facial). En aún otras modalidades, el seroma o el hematoma son el resultado de una cirugía abdominal.
60

65 En diversas modalidades, la matriz de tejido acelular implantada llena al menos una porción del espacio entre los planos tisulares en los que podrían formarse seromas o hematomas. En algunas modalidades, la matriz de tejido acelular implantada es susceptible a la migración y/o proliferación de células nativas dentro de la matriz acelular. La

migración y la proliferación de células nativas de dos o más planos tisulares que rodean el implante pueden dar como resultado una aproximación natural mejorada de planos tisulares separados. En algunas modalidades, la migración y proliferación de células nativas dentro de la matriz de tejido acelular puede conducir a una aproximación de tejidos más rápida de los planos tisulares separados que la que podrían lograr los mismos planos tisulares en ausencia de una matriz de tejido acelular implantada. En ciertas modalidades, la terapia de presión negativa se aplica internamente a la matriz de tejido acelular implantada, mejorando de esta manera la velocidad o la eficacia general de la aproximación de tejidos al aumentar la velocidad y/o el nivel general de migración de células nativas a la matriz de tejido acelular implantada. La terapia de presión negativa también puede ayudar a drenar el fluido del espacio entre los planos tisulares separados, lo que ayuda a tratar o prevenir la formación de seroma/hematoma.

Los métodos para usar composiciones de matriz de tejido acelular para aproximar el tejido (descrito anteriormente) se pueden usar para tratar a un paciente en el que el daño o la enfermedad han dado como resultado la separación de los planos tisulares. En ciertas modalidades, la implantación de matrices de tejido acelular, como se describió anteriormente, se puede usar para llenar el espacio entre los planos tisulares separados y de esta manera ayudar a prevenir la formación de seroma o hematoma. En algunas modalidades, la matriz de tejido acelular implantada también puede proporcionar un armazón estructural en el que las células nativas del tejido circundante migran y proliferan, fomentando de esta manera una aproximación más rápida de los planos tisulares separados, en comparación con el sellado en ausencia de una matriz de tejido acelular implantada.

También se describen en la presente descripción kits para usar en el tratamiento de un paciente que necesita aproximación de tejidos, que comprenden una composición de matriz de tejido acelular (como se describe anteriormente) e instrucciones para usar la composición de matriz de tejido acelular al implantarla entre los planos tisulares separados. El kit puede incluir además un sistema de terapia de presión reducida, como se describió anteriormente.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar, y de ninguna manera limitar, la presente descripción.

Ejemplo 1: Preparación de matrices de tejido acelular de espuma

Se lavaron 55 g - 60 g de dermis humana descelerizada con solución salina, se cortaron en trozos pequeños (1-2 mm) y se homogeneizaron en solución salina de 500 ml en pequeñas fibras de tejido con un mezclador (Modelo 7011HS, Waring Commercial, Torrington, CT). Las fibras de tejido se lavaron con agua destilada dos veces mediante el uso de centrifugación y después se suspendieron en 150 ml de agua destilada (~7 % de masa de tejido, p/v). Se añadió un volumen igual de solución de ácido peracético al 0,2 % (p/v) (neutralizado a pH 7,0 con NaOH) para esterilizar las fibras de tejido durante 2 horas. El residuo de ácido peracético se lavó con agua estéril dos veces.

Las suspensiones de fibra de tejido se fundieron en botes de pesaje que se sellaron en bolsas Tyvek para congelarlas. Las condiciones de liofilización fueron: enfriamiento desde temperatura ambiente a 0 °C a 2 °C/min; enfriamiento de 0 °C a -50 °C a 0,5 °C/min; secado primario a una temperatura de almacenamiento de -15 °C durante 36 horas bajo una presión de cámara de 6,7 Pa;

secado secundario a 20 °C durante 6 horas. Las espumas de dermis humanas liofilizadas tenían una densidad de aproximadamente 4 % (p/v). Las espumas de tejido secas tenían una humedad de ~1,5 % y una temperatura de desnaturalización térmica de aproximadamente 125 °C a 140 °C.

Se aplicaron tratamientos de reticulación a algunas matrices de tejido acelular para estabilizar aún más las espumas de tejido, que incluye el uso de glutaraldehído al 0,1 %, EDAC 20 mM + NHS 10 mM y tratamiento deshidrotérmico.

Para la reticulación con glutaraldehído: el glutaraldehído se diluyó con agua destilada hasta una concentración final de 0,1 % (p/v). Las espumas de tejido liofilizadas se rehidrataron directamente en solución de glutaraldehído al 0,1 % a 4 °C durante 24 horas. Después de la reticulación, las espumas de tejido se enjuagaron con agua destilada y se liofilizaron nuevamente. Las condiciones de liofilización fueron: enfriamiento desde temperatura ambiente hasta -35 °C a 0,2 °C/min y secado a temperatura de almacenamiento -10 °C durante 40 horas.

Para la reticulación con EDAC: 5 mM de lisina, 20 mM de EDAC (hidrocloruro de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida) y NHS 10 mM (N-hidroxisulfosuccinimida) se disolvieron en tampón MES 50 mM (pH 5,5). Las espumas de tejido liofilizadas se rehidrataron directamente en solución EDAC a 4 °C durante 24 horas. Después de la reticulación, las espumas de tejido se enjuagaron con agua destilada y se liofilizaron. Las condiciones de liofilización fueron: enfriamiento desde temperatura ambiente hasta -35 °C a 0,2 °C/min y secado a temperatura de almacenamiento -10 °C durante 40 horas.

Para el tratamiento deshidrotérmico: las espumas de tejido se cargaron en un horno de vacío. La cámara del horno se despresurizó y se calentó a 100 °C - 105 °C. El tratamiento se mantuvo durante 20 horas.

Ejemplo 2: Evaluación de matrices de tejido acelular de espuma porcina

Preparación de matrices de tejido acelular de espuma porcina

5 Las matrices de tejido acelular de espuma porcina se hicieron a partir de una matriz de tejido reconstructivo STRATTICE™ disponible en el mercado (LifeCell Corporation, Branchburg, Nueva Jersey). Todas las etapas del proceso se llevaron a cabo en condiciones asépticas. Las láminas STRATTICE™ se lavaron en agua estéril durante la noche. Las láminas de tejido lavadas se enrollaron en forma cilíndrica, se envasaron asépticamente y se congelaron a -80 °C. Los rollos de tejido congelado se rallaron mediante el uso de un rallador de queso doméstico para hacer
10 fibras de tejido. Las fibras de tejido rallado se suspendieron en agua estéril a ~8 ml de agua por gramo de tejido, y la suspensión se mezcló a 4.000 rpm con un mezclador doméstico (Retsch, PA).

La mezcla se realizó en intervalos de un minuto, seguido de una espera de 5 minutos, durante un tiempo total de mezcla de 5 minutos. La suspensión se fundió después en placas de Petri de plástico cuadradas (80 cm²), cada una con 25-30 ml de suspensión. Las placas de Petri se enfriaron desde temperatura ambiente hasta -30 °C en 60 minutos para congelar la suspensión, y se liofilizaron a una temperatura de almacenamiento de 20 °C durante 36 horas a una presión de la cámara de 13,3 Pa.

Tratamiento deshidrotérmico

20 Las matrices de tejido acelular de espuma porcina liofilizada eran débiles y frágiles. Para estabilizar y fortalecer las espumas de tejido liofilizadas, las espumas de tejido se sometieron a tratamiento deshidrotérmico (DHT). Se colocaron espumas de tejido en bolsas Tyvek estériles en una cámara de vacío: la presión de la cámara se redujo a 13,5 kPa y la temperatura de la cámara se aumentó a 100 ± 5 °C para un tratamiento deshidrotérmico de 24 horas.

25 La estabilidad térmica de las fibras de colágeno en las espumas de tejido se midió con calorimetría diferencial de barrido. La Figura 3 muestra termogramas de espumas de tejido porcino con y sin el tratamiento deshidrotérmico (DHT). Se rehidrataron muestras de espumas de tejido (4 a 5 mg por muestra) en solución salina al 0,9 % a 4 °C durante la noche. Las muestras rehidratadas se secaron por transferencia para eliminar el agua superficial y se sellaron herméticamente en crisoles. La desnaturalización del colágeno se midió a una velocidad de exploración de 3 °C/min de 2 a 110 °C. La temperatura de desnaturalización y la entalpía de las espumas de tejido disminuyeron ligeramente a medida que aumentó la duración del tratamiento deshidrotérmico. Pero, la temperatura de desnaturalización de las espumas de tejido permaneció aproximadamente 15 °C más alta que la temperatura del cuerpo humano.

35 El aumento de los productos finales de glicación avanzada (es decir, productos Maillard) en matrices de tejido acelular de espuma se midió después de la solubilización de muestras de espuma con proteinasa K a 10 mg/ml en Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) que contenía CaCl₂ de 2 mM. El contenido de los productos Maillard se midió por fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 360 ± 20 nm y una longitud de onda de emisión de 440 ± 5 nm, con pentosidina como norma. El contenido de productos Maillard en espumas liofilizadas que no habían sido sometidas a DHT fue de 152 ± 8 μmol/g de material de espuma. Después de la DHT, el contenido de los productos Maillard aumentó a 194 ± 7 μmol/g de material de espuma, lo que indica cierta reticulación entre las fibras de colágeno durante la DHT.

45 Dado que el colágeno tipo I es un componente principal de las matrices de tejido acelular de espuma, se investigó el cambio en la susceptibilidad de la matriz de tejido de espuma a la colagenasa después de la DHT. Se rehidrataron muestras de 20 a 30 mg de material de espuma en 1,5 ml de tampón Tris-HCl a una temperatura de 2 a 8 °C durante la noche. Se añadió una alícuota de 60 μl de solución madre de colagenasa (10 mg/ml) para cada muestra y se realizó la digestión enzimática a 37 °C de hasta 9 horas. El porcentaje de tejido restante después de la digestión con colagenasa durante varios períodos de tiempo fue significativamente mayor después de la DHT. Ver la Figura 4. Estos datos son consistentes con la medición del aumento de los productos Maillard después de la DHT, lo que sugiere un aumento de la reticulación durante la DHT.

Respuestas in vivo con ratas inmunocompetentes

55 Las matrices de tejido acelular de espuma porcina (6 a 8 % p/v) se evaluaron mediante implantación subcutánea en ratas inmunocompetentes. Se rehidrataron cuatro piezas de espuma de tejido (cada una con dimensiones de 1 cm x 3 cm, 2 mm de grosor) en solución salina al 0,9 %, y cada pieza se plegó para formar un implante de espuma de 3 capas de grosor (que tenía dimensiones 1 cm x 1 cm, ~6 mm de grosor), como se muestra en la Figura 5.

60 Las espumas de tejido plegadas se implantaron en bolsas subcutáneas en el lomo de las ratas. Los bolsillos se formaron por disección roma para separar las capas de tejido. Después de la colocación de espumas de tejido plegadas, la piel se cerró con suturas no absorbibles 4-0. Cuatro (4) semanas después de la implantación, se sacrificaron los animales y se recuperaron las espumas de tejido implantadas para la evaluación de las respuestas biológicas.

65 La evaluación general de las matrices de tejido acelular de espuma porcina explantada mostró que las espumas de tejido estaban bien integradas dentro del tejido animal y habían comenzado a volver a vascularizarse (flechas en las

Figuras 6B y 6D). Ver la Figura 6. No hubo una disminución significativa en el volumen de material de espuma implantado. Las células hospedadoras ya habían repoblado la capa externa de espumas de tejido y habían formado un nuevo material de matriz de tejido extracelular. El interior de las espumas de tejido permaneció poroso sin colapsar.

- 5 Los ejemplos anteriores pretenden ilustrar y de ninguna manera limitar la presente descripción. Otras modalidades de los dispositivos y métodos descritos serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la consideración de la descripción y la práctica de los dispositivos y métodos descritos en la presente descripción.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una matriz de tejido acelular que comprende una matriz extracelular de un tejido descelularizado para usar en un método para evitar la formación de un seroma o hematoma aproximando el tejido separado al implantar la matriz de tejido acelular en un espacio entre dos o más planos tisulares separados, en donde la matriz de tejido acelular implantada comprende una espuma capaz de soportar la migración y proliferación de células del tejido circundante después de la implantación.
- 10 2. La matriz de tejido acelular para el uso de la reivindicación 1, en donde la matriz de tejido acelular implantada comprende además una o más células viables que son histocompatibles con el paciente en el que se van a implantar.
- 15 3. La matriz de tejido acelular para el uso de la reivindicación 2, en donde la una o más células viables son células madre.
4. La matriz de tejido acelular para el uso de la reivindicación 1, en donde la matriz de tejido acelular implantada se asegura a los planos tisulares circundantes mediante el uso de suturas biodegradables.
- 20 5. La matriz de tejido acelular para el uso de la reivindicación 1, en donde la matriz de tejido acelular implantada se asegura a los planos tisulares circundantes al aplicar presión externa positiva a los planos tisulares que rodean la matriz de tejido acelular implantada.
- 25 6. La matriz de tejido acelular para el uso de la reivindicación 5, en donde la presión externa positiva comprende un apósito o unión alrededor de los planos tisulares.
7. La matriz de tejido acelular para el uso de la reivindicación 1, que comprende además un dispositivo de terapia de presión reducida.
- 30 8. La matriz de tejido acelular para el uso de la reivindicación 7, en donde el dispositivo de terapia de presión reducida comprende una fuente de presión negativa que está conectada de manera fluida por un conducto o tubo de fluido a la matriz de tejido acelular y en donde el dispositivo de terapia de presión reducida suministra presión interna negativa a la matriz de tejido acelular.
- 35 9. La matriz de tejido acelular para el uso de la reivindicación 8, en donde la matriz de tejido acelular se asegura a los planos tisulares circundantes por la presión interna negativa.
- 40 10. La matriz de tejido acelular para el uso de la reivindicación 8, que comprende además un colector poroso que se coloca en o cerca de la matriz de tejido acelular implantada, se conecta a la fuente de presión negativa por el conducto o tubo de fluido, y distribuye presión negativa dentro o cerca de la matriz de tejido acelular implantada.
- 45 11. La matriz de tejido acelular para el uso de la reivindicación 8, en donde la fuente de presión negativa es una bomba.
12. La matriz de tejido acelular para el uso de la reivindicación 8, que comprende además un paño para sellar un sitio donde se ha implantado una matriz de tejido acelular.
- 50 13. Un kit para usar en el tratamiento de un paciente que necesita aproximación de tejidos para evitar la formación de un seroma o hematoma, que comprende la matriz de tejido acelular de la reivindicación 1 e instrucciones para usar la matriz de tejido acelular al implantar la matriz de tejido acelular entre los planos tisulares separados.
14. El kit de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende además un dispositivo de terapia de presión reducida.

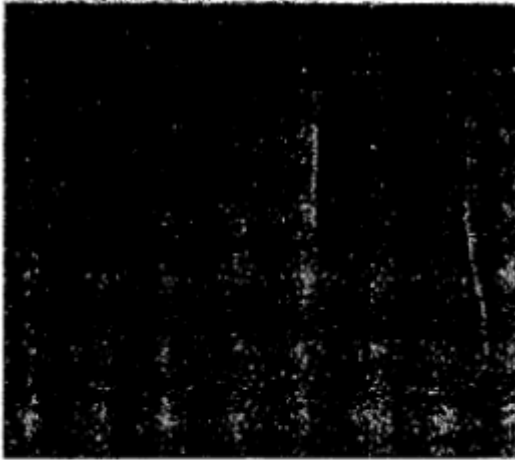


FIGURA 1A

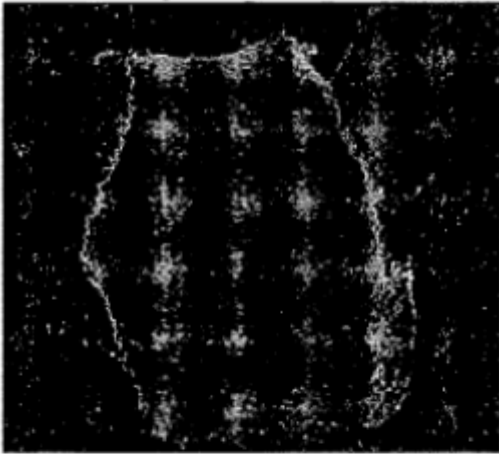


FIGURA 1B

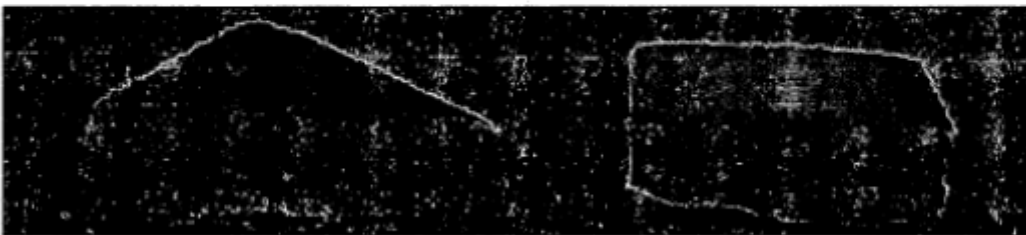


FIGURA 1C

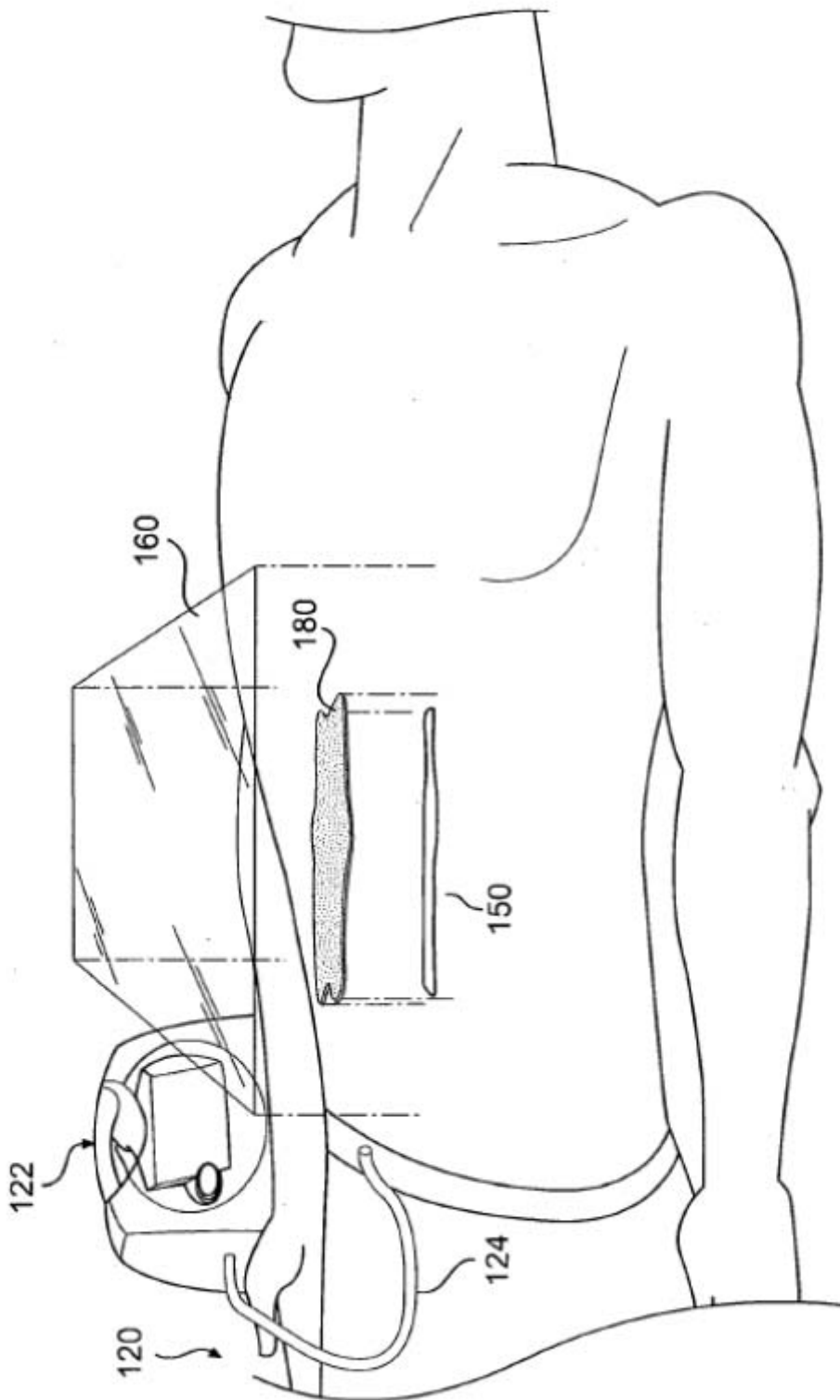


FIGURA 2

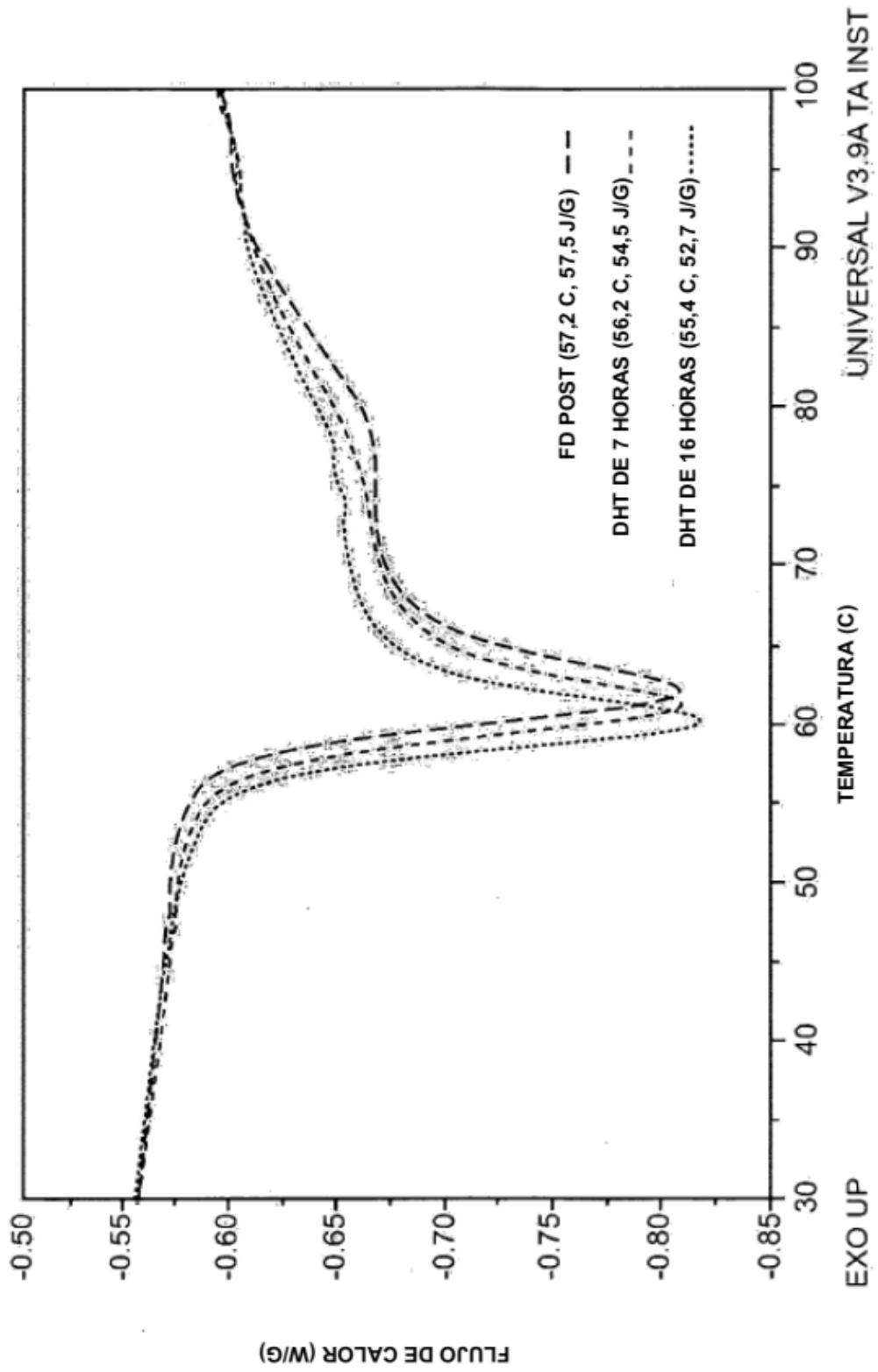


FIGURA 3

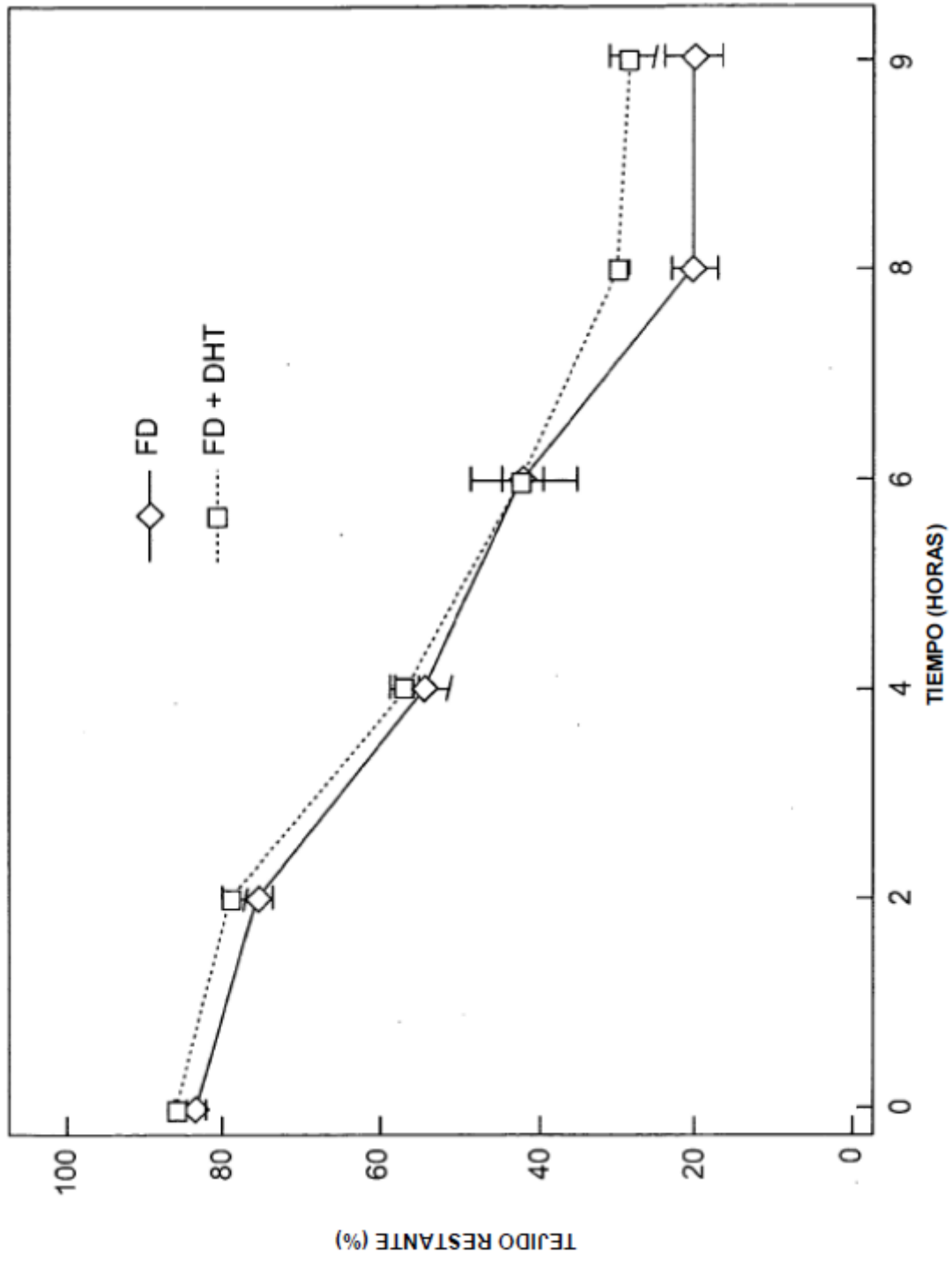


FIGURA 4

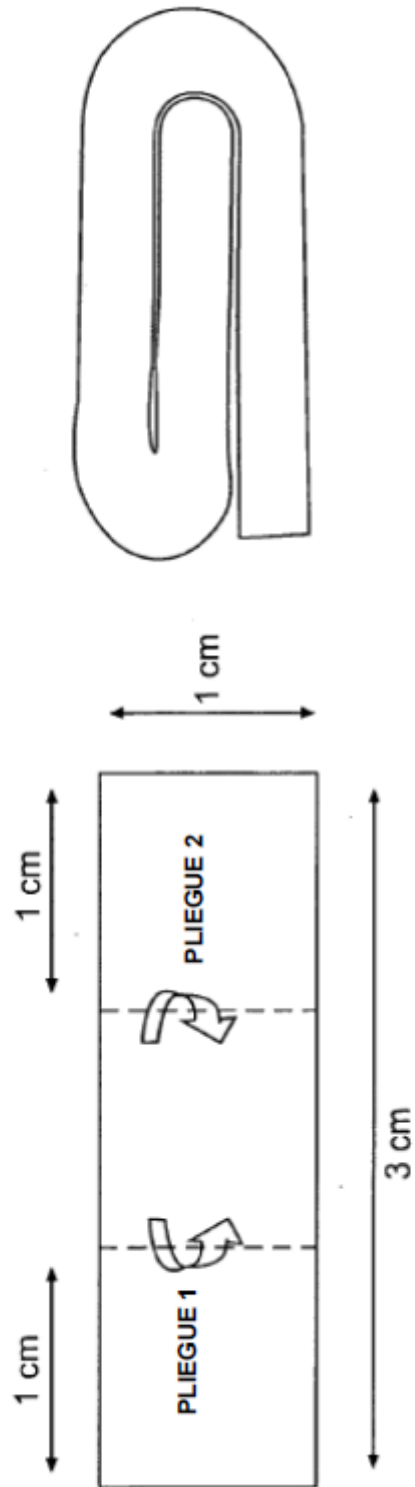


FIGURA 5



FIGURA 6C

FIGURA 6D



FIGURA 6D



FIGURA 6A



FIGURA 6B