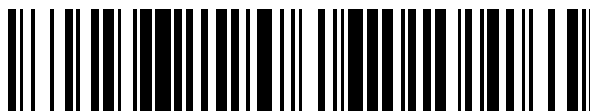


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 788 749**

51 Int. Cl.:

A61L 27/24 (2006.01)

A61L 27/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.08.2011** **PCT/US2011/049062**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.03.2012** **WO12027529**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.08.2011** **E 11757706 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2020** **EP 2608814**

54 Título: **Métodos pasivos para mallas biológicas antimicrobianas**

30 Prioridad:

26.08.2010 US 377182 P

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

22.10.2020

73 Titular/es:

LIFECCELL CORPORATION (100.0%)

5 Giralda Farms

Madison, New Jersey 07940, US

72 Inventor/es:

OWENS, RICK, T.;

LIU, MIKE y

MAO, YONG

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 788 749 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 pasivos para mallas biológicas antimicrobianas

- 5 La presente descripción se refiere a matrices de tejidos, y más particularmente, a métodos para preparar matrices de tejidos que incorporan agentes antimicrobianos y matrices de tejidos preparadas de acuerdo con esos métodos.

Se usan varias matrices derivadas de tejidos para regenerar, reparar, o de otra manera tratar tejidos y órganos enfermos o dañados. Tales matrices pueden incluir injertos de tejidos intactos y/o tejidos acelulares o acelulares reconstituidos (por ejemplo, matrices de tejidos acelulares de piel, intestino, u otros tejidos, con o sin siembra celular). Al igual que con muchos cuerpos extraños implantados, la infección puede ocurrir después del uso de tales materiales en aplicaciones quirúrgicas. El documento núm. WO 2007/048099 describe dispositivos de reparación quirúrgica que comprenden una matriz de tejido acelular con nitrato de plata secado encima. El documento núm. WO 2007/106581 describe una matriz de tejido con un agente antimicrobiano catiónico unido por interacciones iónicas. El documento núm. US 4599 226 describe una matriz de piel de cerdo con un agente antimicrobiano catiónico unido.

La producción de matrices de tejidos con una actividad antimicrobiana aumentada puede reducir la tasa de infección del injerto y aumentar la probabilidad de éxito después de la cirugía. Por consiguiente, se proporcionan métodos para producir materiales biológicos mediante la unión de agentes antimicrobianos a una matriz de tejido. En adición, se proporcionan, además, matrices de tejidos producidas por tales métodos.

La invención se define en las reivindicaciones.

Se proporciona un método para preparar una matriz de tejido. El método comprende seleccionar una matriz de tejido basada en colágeno y poner en contacto la matriz de tejido con una solución acuosa que contiene un agente antimicrobiano catiónico, en donde el agente se une establemente a la matriz mediante adsorción pasiva, en donde la matriz de tejido no se reticula durante la unión del agente antimicrobiano. El agente puede mantener la unión con la matriz cuando se coloca en un tampón fisiológico a temperatura ambiente durante períodos prolongados.

Se proporciona una matriz de tejido. La matriz comprende una matriz de tejido que se preparó mediante la selección de una matriz de tejido basada en colágeno y la puesta en contacto de la matriz con una solución acuosa que contiene un agente antimicrobiano catiónico, en donde el agente se une establemente a la matriz mediante adsorción pasiva, en donde la matriz de tejido no se reticula durante la unión del agente antimicrobiano.

Se proporciona una matriz de tejido. La matriz comprende una matriz de tejido basada en colágeno y al menos un agente antimicrobiano catiónico que se une establemente a la matriz mediante adsorción pasiva, en donde la matriz de tejido no se reticula durante la unión del agente antimicrobiano.

Descripción de las figuras

La Figura 1 es un gráfico que compara la respuesta del tejido in vivo de varias matrices de tejido, de acuerdo con ciertas modalidades, como se describe en el Ejemplo 1.

Las Figuras 2A y 2B son secciones histológicas de varias matrices de tejidos después de la implantación en un animal, de acuerdo con ciertas modalidades, como se describe en el Ejemplo 1.

Las Figuras 3A y 3B son gráficos que comparan la actividad antimicrobiana de varias matrices de tejidos como se describe en el Ejemplo 3.

Descripción de ciertas modalidades ejemplares

Ahora se hará referencia en detalle a ciertas modalidades ejemplares de acuerdo con la presente descripción, ciertos ejemplos de las cuales se ilustran en las figuras adjuntas. Siempre que sea posible, se usarán los mismos números de referencia en todas las figuras para referirse a las mismas partes o partes similares.

En esta aplicación, el uso del singular incluye el plural a menos que se indique específicamente de otra manera. En esta aplicación, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique de otra manera. Además, el uso del término "que incluye" o "que comprende", así como otras formas, tales como "incluye" e "incluido", "comprende" o "comprendido" no es limitante. Se entenderá que cualquier intervalo descrito en la presente descripción incluye los puntos finales y todos los valores entre los puntos finales. Se entenderá que los beneficios y ventajas descritos anteriormente pueden relacionarse con una modalidad o pueden relacionarse con varias modalidades. Cuando sea apropiado, los aspectos de cualquiera de los ejemplos y modalidades descritos anteriormente pueden combinarse con aspectos de cualquiera de los otros ejemplos descritos para formar ejemplos adicionales que tengan propiedades comparables o diferentes y aborden los mismos o diferentes problemas.

Los encabezados de sección usados en la presente descripción son solo para fines organizativos y no deben interpretarse como limitantes del tema descrito. Como se usa en la presente descripción, "matriz de tejido" se referirá a material derivado de tejido animal que incluye una matriz que contiene colágeno. Tales matrices de tejidos pueden incluir tejidos intactos, tejidos descelularizados parcialmente o completamente, o matrices de colágeno sintéticas (por ejemplo, matrices 3-D formadas a partir de tejidos suspendidos o procesados de otra manera). Como se describe más adelante, las matrices de tejidos adecuadas pueden ser acelulares. Puede usarse cualquier matriz de tejido adecuada, en dependencia del sitio de implantación previsto, siempre que el tejido se una establemente a los agentes antimicrobianos, como se describe en la presente descripción. La estabilidad de la unión de los agentes antimicrobianos puede determinarse de varias maneras. Por ejemplo, un método para medir la estabilidad se describe a continuación en el Ejemplo 3, en donde las matrices de tejidos modificadas se lavan en PBS a temperatura corporal durante 14 días para determinar si el lavado en tales tampones da como resultado la pérdida de propiedades antimicrobianas.

Pueden usarse varias matrices de tejidos humanos y animales para producir matrices para el tratamiento de pacientes. Por ejemplo, varias matrices de tejidos están disponibles para la regeneración, reparación, aumento, refuerzo, y/o tratamiento de tejidos humanos que se dañaron o perdieron debido a diversas enfermedades y/o daños estructurales (por ejemplo, traumatismos, cirugía, atrofia, y/o desgaste y degeneración a largo plazo) que se produjeron. Sin embargo, tales tejidos generalmente se implantan mediante el uso de procedimientos invasivos, y tales procedimientos (por ejemplo, que incluyen una incisión, punción, etc.) pueden predisponer a un paciente a la infección. En adición, un cuerpo extraño, que incluye una matriz de tejido u otro dispositivo implantable usado junto con el implante (por ejemplo, implante mamario, malla polimérica, etc.) puede aumentar la posibilidad de infección después de la cirugía. En consecuencia, son deseables las matrices de tejidos acelulares que reducen la posibilidad de infección.

Se proporciona un método para preparar una matriz de tejido modificada. El método comprende seleccionar una matriz de tejido basada en colágeno y poner en contacto la matriz de tejido con una solución acuosa que contiene un agente antimicrobiano catiónico, en donde el agente se une establemente a la matriz mediante adsorción pasiva. Este método elimina la necesidad de modificar químicamente la matriz de tejido o el antimicrobiano, lo que asegura de esta manera la funcionalidad completa de los componentes respectivos. Puede proporcionarse una matriz de tejido. La matriz de tejido modificada comprende una matriz de tejido que se preparó mediante la selección de una matriz de tejido basada en colágeno y la puesta en contacto de la matriz con una solución acuosa que contiene un agente antimicrobiano catiónico, en donde el agente se une establemente a la matriz mediante adsorción pasiva. Puede proporcionarse una matriz de tejido. La matriz comprende una matriz de tejido basada en colágeno y al menos un agente antimicrobiano catiónico que se une establemente a la matriz por adsorción pasiva.

En diversas modalidades, la solución usada para aplicar el agente antimicrobiano catiónico puede incluir una variedad de soluciones acuosas diferentes. Por ejemplo, la solución acuosa usada puede ser no desnaturizante. Las condiciones no desnaturizantes permiten que los agentes antimicrobianos retengan sus propiedades catiónicas, lo que permite la unión por adsorción pasiva. La solución debe permitir que el agente antimicrobiano presente una carga positiva que es necesaria para la unión al tejido. La solución debe, además, ser compatible con la matriz de tejido y no inducir daños permanentes o irreversibles. La solución acuosa no desnaturizante puede ser agua. La solución puede comprender, por ejemplo, solución salina isotónica, PBS, HEPES, u otros tampones adecuados.

Puede usarse cualquier agente antimicrobiano catiónico adecuado con los procesos y las matrices de tejidos de la presente descripción. El agente antimicrobiano de la invención incluye al menos uno de cloruro de bencetonio, clorhexidina, cloruro de benzalconio, y nitrato de plata. Los compuestos antimicrobianos descritos incluyen hidrocloreuro de polihexametileno biguanida, péptidos catiónicos tales como nisina, catelicidina, y abaecina, compuestos de amonio cuaternario tales como cloruro de metilbencetonio, cloruro de cetalconio, cloruro de dofano, bromuro de tetraetilamonio, cloruro de didecildimetilamonio, y bromuro de domifeno. En algunas modalidades, pueden usarse combinaciones de diferentes agentes antimicrobianos. Los ejemplos de combinaciones antimicrobianas incluyen plata y clorhexidina, así como clorhexidina con diversos compuestos de amonio cuaternario.

La cantidad de agente antimicrobiano catiónico en la solución acuosa no desnaturizante puede prepararse a diversas concentraciones. La concentración específica puede depender de una variedad de factores. Por ejemplo, para algunas aplicaciones, el riesgo potencial de infección puede ser mayor que para otras, y pueden usarse concentraciones más altas de antimicrobianos. En otros casos, demasiado antimicrobiano puede tener efectos tóxicos o de otra manera adversos sobre los tejidos, y pueden seleccionarse concentraciones más bajas.

La concentración de cloruro de bencetonio en agua o HEPES puede estar en el intervalo de 0,025 % a 1,0 % p/v o de 0,01 % a 1,0 % p/v. La concentración de clorhexidina en agua o HEPES puede estar en el intervalo de 0,002 % a 0,2 % p/v. La concentración de nitrato de plata en agua o HEPES puede estar en el intervalo de 0,0005 % a 0,1 % p/v. La concentración de cloruro de bencetonio puede ser de 0,05 %, 0,25 %, o 0,5 % p/v, o de al menos 0,05 %, 0,25 %, o 0,5 % p/v. La concentración de clorhexidina puede ser de 0,004 %, 0,02 % o 0,1 % p/v, o de al menos 0,004 %, 0,02 %, o 0,1 % p/v. La concentración de nitrato de plata puede ser de 0,001 %, 0,005 %, o 0,05 % p/v, o de al menos 0,001 %, 0,005 %, o 0,05 % w/v. La concentración de cloruro de benzalconio puede ser de 0,02 %, 0,1 %, o 0,5 % p/v, o de al menos 0,02 %, 0,1 %, o 0,5 % p/v. En un aspecto, las concentraciones descritas son efectivas al menos durante 7 días. En otro aspecto, las concentraciones son efectivas al menos durante 14 días.

Los agentes antimicrobianos catiónicos tales como clorhexidina, compuestos de amonio cuaternario, quitosano, o los iones de plata pueden disolverse en agua o en un solvente apropiado a una concentración adecuada. La matriz de tejido acelular se coloca después en la solución antimicrobiana y se incuba durante un tiempo y temperatura suficientes para permitir la unión de una cantidad deseada de antimicrobiano. Por ejemplo, un tiempo de incubación típico para antimicrobianos disueltos en HEPES o agua es de 4 horas a temperatura ambiente. Después de la incubación, los compuestos antimicrobianos no unidos se eliminan mediante el lavado en un tampón tal como HEPES.

El procesamiento de matrices de tejidos acelulares para mejorar las propiedades antimicrobianas de las matrices puede afectar negativamente las propiedades biológicas de tales matrices. Por ejemplo, la reticulación química puede usarse para unir el agente antimicrobiano a la matriz, pero la reticulación excesiva puede alterar las propiedades biológicas del tejido, lo que previene de esta manera la respuesta deseada del tejido cuando se implanta (por ejemplo, regeneración, remodelación, refuerzo, reparación, etc. en dependencia del uso específico). La reticulación excesiva puede, además, afectar negativamente la actividad antimicrobiana del agente usado. En adición, los agentes de reticulación química pueden ser perjudiciales para los pacientes una vez implantados en el cuerpo. Los métodos de la presente descripción permiten la producción de matrices de tejidos acelulares que incluyen compuestos antimicrobianos, que se unen establemente a las matrices sin el uso de reticulación química. Dado que la matriz de colágeno no se altera significativamente, es decir, no se reticula o desnaturaliza, el proceso no causa cambios inadecuados en la respuesta del tejido regenerativa inherente de la matriz in vivo según se determinó por infiltración celular, revascularización, e inflamación de los tejidos tratados. La reticulación o la desnaturalización de las proteínas puede medirse mediante una serie de procesos tales como la calorimetría diferencial de barrido (DSC) o los ensayos de hidrólisis enzimática con colagenasa, que pueden mostrar cambios debido a la reticulación, desnaturalización, u otras alteraciones de las proteínas.

En adición, la unión del compuesto antimicrobiano a la matriz de tejido por adsorción pasiva no modifica sustancialmente el agente antimicrobiano. Otros medios de unión, tales como la reticulación, pueden dar como resultado modificaciones al agente antimicrobiano, y el uso de condiciones desnaturalizantes puede conducir también a modificaciones del agente antimicrobiano. Estas modificaciones pueden conducir a consecuencias no deseadas, tales como una pérdida de efectividad. Debido a que la reticulación química no es necesaria para unir el compuesto antimicrobiano a las matrices, el compuesto antimicrobiano no es inaceptablemente modificado por el proceso de unión, y se preserva la actividad antimicrobiana.

Como se señaló anteriormente, las matrices de tejidos implantables pueden implantarse en o sobre el cuerpo durante la cirugía o mediante el uso de otros procedimientos algo invasivos. Es beneficioso que las propiedades antimicrobianas que poseen estas matrices permanezcan activas durante el período crítico de infección oportunista después de la cirugía, usualmente de una a dos semanas. Las propiedades antimicrobianas resultantes de las matrices de tejidos producidas a partir del método descrito pueden estar activas durante un período de tiempo significativo después de la implantación en o sobre el cuerpo. Por ejemplo, las propiedades antimicrobianas se retienen durante al menos una semana, al menos dos semanas, al menos tres semanas, o al menos un mes después de la implantación.

El método y las matrices de tejidos descritos pueden usarse junto con una variedad de otras etapas de procesamiento de tejidos. Por ejemplo, las matrices de tejidos implantables se tratan típicamente para producir materiales asépticos o estériles. En consecuencia las matrices de tejidos pueden procesarse para unir compuestos antimicrobianos antes y/o después de la realización de otros procesos de esterilización diseñados para reducir o eliminar los patógenos de los tejidos. Como se usa en la presente descripción, un "proceso de esterilización" puede incluir cualquier proceso que reduzca la carga biológica en una muestra, pero no es necesario que haga a la muestra absolutamente estéril.

Ciertos procesos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, un proceso de irradiación gamma, un proceso de irradiación con haz de electrones, un proceso de esterilización con dióxido de carbono supercrítico, y un proceso de tratamiento con ácido peracético. Los procesos de esterilización adecuados incluyen, pero no se limitan a, aquellos descritos en, por ejemplo, la publicación de patente de EE. UU. núm. 2006/0073592A1, de Sun y otros; patente de EE. UU. núm. 5,460,962 de Kemp; publicación de patente de EE. UU. núm. 2008/0171092A1, de Cook y otros. La aplicación del agente antimicrobiano puede ocurrir antes o después del proceso de esterilización. En algunas modalidades, el proceso de esterilización puede ser un proceso de esterilización terminal que se realiza justo antes o después de envasar una muestra de tejido.

En ciertas modalidades, el proceso antimicrobiano se aplica antes de un proceso de esterilización terminal mediante el uso de cualquier proceso de esterilización terminal adecuado. En algunas modalidades, la esterilización terminal de la matriz de tejido puede incluir el uso de radiación. En diversas modalidades, las formas adecuadas de radiación incluyen radiación gamma y radiación de rayos X. En una modalidad, la esterilización se realiza mediante el uso de radiación de haz de electrones. Además, pueden usarse combinaciones de diversos procesos de esterilización.

Después del procesamiento para unir los compuestos antimicrobianos y/o realizar la esterilización u otras etapas de procesamiento, las matrices de tejidos pueden almacenarse durante algún tiempo antes de la implantación en un paciente. Además, en algunos casos, las matrices de tejidos pueden almacenarse en medio líquido, por ejemplo, soluciones acuosas de conservación, o pueden congelarse y/o liofilizarse. En consecuencia, sea cual sea el método

de almacenamiento usado, es importante que la composición antimicrobiana permanezca unida establemente durante el almacenamiento. En diversas modalidades, las matrices de tejidos de la presente descripción retendrán las propiedades antimicrobianas por períodos prolongados durante el almacenamiento en soluciones acuosas. En algunas modalidades, el compuesto antimicrobiano permanece unido establemente durante el almacenamiento por hasta 1 mes, 2 meses, 3 meses, o 4 meses, o más.

Matrices de tejidos adecuadas

Como se señaló anteriormente, los métodos descritos en la presente descripción pueden usarse para producir productos que tienen propiedades antimicrobianas mediante el uso de una variedad de diferentes tipos de tejido, siempre que el tejido incluya una matriz que contenga colágeno a la que los antimicrobianos catiónicos puedan unirse establemente. Tales matrices de tejidos pueden incluir tejidos intactos, tejidos descelularizados parcialmente o completamente, o matrices de colágeno sintéticas (por ejemplo, matrices 3-D formadas a partir de tejidos suspendidos o procesados de otra manera).

La matriz de tejido puede producirse a partir de una variedad de tipos de tejido. Por ejemplo, la matriz de tejido puede derivarse de la fascia, tejido pericárdico, duramadre, tejido umbilical, tejido placentario, tejido de la válvula cardíaca, tejido del ligamento, tejido del tendón, tejido arterial, tejido venoso, tejido conectivo neural, tejido de la vejiga urinaria, tejido del uréter, y tejido intestinal. En la invención, la matriz de tejido comprende una matriz de tejido dérmico. En ciertas modalidades, la matriz de tejido comprende matriz dérmica porcina.

Los tejidos pueden incluir un tejido blando de mamífero. Por ejemplo, el tejido puede incluir dermis de mamífero. En ciertas modalidades, la dermis puede separarse de la epidermis circundante y/u de otros tejidos, tales como la grasa subcutánea. La muestra de tejido puede incluir submucosa del intestino delgado. Las muestras de tejido pueden incluir fuentes humanas o no humanas. Ejemplos de fuentes de tejido no humano adecuadas incluyen, pero no se limitan a, cerdos, ovejas, cabras, conejos, monos, y/u otros mamíferos no humanos.

Las matrices de tejidos pueden implantarse o ser implantables en una variedad de sitios anatómicos diferentes. Por ejemplo, las matrices de tejidos pueden implantarse alrededor de los implantes mamarios; alrededor o como reemplazo de estructuras vasculares; alrededor o como reemplazo de estructuras lumenales (por ejemplo, uréteres, nervios, tejidos linfáticos, estructuras gastrointestinales); sobre o como reemplazo de válvulas cardíacas, pericardio, u otras estructuras cardíacas; dentro o sobre materiales óseos o cartilaginosos (por ejemplo, orejas, narices, superficies articulares, alrededor de estructuras dentales, o a lo largo de cualquier hueso corto o largo); y/o alrededor de, como forro de, apoyo de o reemplazo de cualquier cavidad del cuerpo (por ejemplo, vejiga, estómago).

Las matrices de tejidos pueden seleccionarse para proporcionar una variedad de diferentes propiedades biológicas y mecánicas. Por ejemplo, puede seleccionarse una matriz de tejido acelular para permitir el crecimiento interno y remodelación del tejido para ayudar en la regeneración del tejido que normalmente se encuentra en el sitio donde se implanta la matriz. Por ejemplo, una matriz de tejido acelular, cuando se implanta sobre o dentro de la fascia, puede seleccionarse para permitir la regeneración de la fascia sin fibrosis excesiva o formación de cicatriz. En ciertas modalidades, la matriz de tejido puede formarse a partir de ALLODERM® o STRATTICE™, que son matrices dérmicas acelulares humanas y porcinas, respectivamente. Alternativamente, pueden usarse otras matrices de tejidos acelulares adecuadas, como se describe más adelante.

El material a base de colágeno comprende una matriz de tejido acelular. Estas matrices pueden descelularizarse completamente para producir matrices de tejidos acelulares que se usarán para los pacientes. Por ejemplo, varios tejidos, tales como piel, intestino, hueso, cartilago, tejido nervioso (por ejemplo, fibras nerviosas o duramadre), tendones, ligamentos, u otros tejidos pueden descelularizarse por completo para producir matrices de tejidos útiles para los pacientes. Los procesos adecuados para producir matrices de tejidos acelulares se describen a continuación.

En general, las etapas implicadas en la producción de una matriz de tejido acelular incluyen la recolección del tejido de un donante (por ejemplo, un cadáver humano o una fuente animal) y la eliminación de células en condiciones que preservan la función biológica y estructural. El proceso puede incluir tratamiento químico para estabilizar el tejido y evitar la degradación bioquímica y estructural junto con o antes de la extracción celular. La solución estabilizante puede detener y prevenir la degradación osmótica, hipóxica, autolítica, y proteolítica, protege contra la contaminación microbiana, y reduce el daño mecánico que puede ocurrir con los tejidos que contiene, por ejemplo, componentes del músculo liso (por ejemplo, vasos sanguíneos). La solución estabilizadora puede contener un tampón apropiado, uno o más antioxidantes, uno o más agentes oncóticos, uno o más antibióticos, uno o más inhibidores de proteasas, y/o uno o más relajantes del músculo liso.

Después el tejido se coloca en una solución de descelularización para eliminar células viables (por ejemplo, células epiteliales, células endoteliales, células de músculo liso, y fibroblastos) de la matriz estructural sin dañar la integridad biológica y estructural de la matriz de colágeno. La solución de descelularización puede contener uno o más de un tampón apropiado, sal, un antibiótico, uno o más detergentes (por ejemplo, TRITON X-100™, desoxicolato de sodio, monooleato de polioxietileno (20) sorbitano), uno o más agentes para prevenir la reticulación, uno o más inhibidores de proteasas, y/o una o más enzimas. La solución de descelularización puede comprender 1% de TRITON X-100™ en

medio RPMI con Gentamicina y EDTA 25 mM (ácido etilendiaminotetraacético). El tejido puede incubarse en la solución de descelularización durante la noche a 37 °C con agitación suave a 90 rpm. Por ejemplo, se adiciona 1-3 % de desoxicolato de sodio o 2 % de desoxicolato de sodio a la solución de descelularización.

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

Si bien una matriz de tejido acelular puede obtenerse a partir de uno o más individuos de la misma especie que el receptor del injerto de matriz de tejido acelular, este no es necesariamente el caso. Así, por ejemplo, una matriz de tejido acelular puede obtenerse a partir de tejido porcino e implantarse en un paciente humano. Las especies que pueden servir como receptores de la matriz de tejido acelular y donantes de tejidos u órganos para la producción de la matriz de tejido acelular incluyen, sin limitación, mamíferos, tales como seres humanos, primates no humanos (por ejemplo, monos, babuinos, o chimpancés), cerdos, vacas, caballos, cabras, ovejas, perros, gatos, conejos, cobayas, jerbos, hámsteres, ratas, o ratones.

La eliminación de los epítomos α -gal del material que contiene colágeno puede disminuir la respuesta inmune contra el material que contiene colágeno. El epítomo α -gal se expresa en mamíferos no primates y en monos del Nuevo Mundo (monos de América del Sur) así como en macromoléculas tales como los proteoglicanos de los componentes extracelulares. U. Galili y otros, J. Biol. Chem 263: 17 755 (1988). Sin embargo, este epítomo está ausente en los primates del Viejo Mundo (monos de Asia y África y simios) y en los seres humanos. Id. Los anticuerpos anti-gal se producen en seres humanos y primates como resultado de una respuesta inmune a las estructuras del epítomo α -gal de carbohidratos en bacterias gastrointestinales. U. Galili y otros, Infect. Immun. 56: 1730 (1988); RM Hamadeh y otros, J. Clin. Invest. 89: 1223 (1992).

Dado que los mamíferos no primates (por ejemplo, cerdos) producen epítomos α -gal, el xenotrasplante de material que contiene colágeno de estos mamíferos a primates a menudo da como resultado una activación inmunológica debido a la unión de anticuerpos anti-Gal de primates a estos epítomos en el material que contiene colágeno. U. Galili y otros, Immunology Today 14: 480 (1993); M. Sandrin y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 11 391 (1993); H. Good y otros, Transplant. Proc. 24: 559 (1992); BH Collins y otros, J. Immunol. 154: 5500 (1995). Además, el xenotrasplante da como resultado una activación importante del sistema inmune para producir cantidades aumentadas de anticuerpos anti-gal de alta afinidad. Por consiguiente, cuando los animales que producen epítomos α -gal se usan como fuente de tejidos, la eliminación sustancial de epítomos α -gal de las células y de los componentes extracelulares del material que contiene colágeno, y la prevención de la reexpresión de epítomos α -gal celulares puede disminuir la respuesta inmune contra el material que contiene colágeno asociada con la unión del anticuerpo anti-gal a los epítomos α -gal.

Para eliminar los epítomos α -gal, después de lavar el tejido a fondo con solución salina para eliminar la solución de DNasa, la muestra de tejido puede someterse a uno o más tratamientos enzimáticos para eliminar ciertos antígenos inmunogénicos, si están presentes en la muestra. La muestra de tejido puede tratarse con una enzima α -galactosidasa para eliminar los epítomos α -gal si están presentes en el tejido. La muestra de tejido puede tratarse con α -galactosidasa a una concentración de 300 U/L preparada en tampón fosfato 100 mM a pH 6,0. La concentración de α -galactosidasa puede aumentarse a 400 U/L para la eliminación adecuada de los epítomos α -gal del tejido recolectado. Puede usarse cualquier concentración de enzima y tampón adecuadas siempre que se logre una eliminación suficiente de antígenos. Por ejemplo, se deben eliminar suficientes antígenos para prevenir el rechazo agudo u otras respuestas inmunitarias graves cuando se implantan. En algunas modalidades, se eliminan todos o casi todos los epítomos α -gal.

Alternativamente, en lugar de tratar el tejido con enzimas, pueden seleccionarse como la fuente de tejido animales que se modificaron genéticamente para carecer de uno o más epítomos antigénicos. Por ejemplo, los animales (por ejemplo, cerdos) que se modificaron genéticamente para carecer del resto de α -galactosa terminal pueden seleccionarse como la fuente de tejido. Para las descripciones de los animales apropiados ver la patente de EE. UU. núm. 6,166,288 y la solicitud de EE. UU. núm. de serie 10/896,594 en trámite. En adición, se describen ciertos métodos ejemplares de procesamiento de tejidos para producir matrices acelulares con o sin cantidades reducidas o que carecen de restos alfa-1,3-galactosa en Xu, Hui y otros, "A Porcine-Derived Acellular Dermal Scaffold that Supports Soft Tissue Regeneration: Removal of Terminal Galactose- α -(1,3)-Galactose and Retention of Matrix Structure," Tissue Engineering, vol. 15, 1-13 (2009).

Después de que se forma la matriz de tejido acelular, pueden sembrarse opcionalmente células viables histocompatibles en la matriz de tejido acelular para producir un injerto que puede remodelarse aún más por el huésped. Las células viables histocompatibles pueden adicionarse a las matrices mediante técnicas de cocultivo celular in vitro estándar antes del trasplante, o mediante repoblación in vivo después del trasplante. La repoblación in vivo puede ser por las propias células del receptor que migran hacia la matriz de tejido acelular o por infusión o inyección de células obtenidas del receptor o células histocompatibles de otro donante en la matriz de tejido acelular.

in situ. Pueden usarse diversos tipos de células, que incluyen células madre embrionarias, células madre adultas (por ejemplo, células madre mesenquimales) y/o neuronales. Las células pueden aplicarse directamente a la porción interna de la matriz de tejido acelular justo antes o después de la implantación. Las células pueden colocarse dentro de la matriz de tejido acelular a implantar y cultivarse antes de la implantación.

Aunque se describen los parámetros generales del proceso para la producción de matrices de tejidos acelulares, se dispone de una variedad de materiales acelulares que contienen colágeno, y los métodos de procesamiento de tales materiales para producir propiedades antimicrobianas pueden usarse con cualquiera de esos materiales. Por ejemplo, Badylak y otros describen una serie de materiales de andamiaje biológicos, y los métodos de la presente descripción pueden usarse para producir matrices con propiedades antimicrobianas mediante el uso de cualquiera de esos materiales, o cualquier otro material similar. Badylak y otros, "Extracellular Matrix as a Biological Scaffold Material: Structure and Function," Acta Biomaterialia (2008), doi:10.1016/j.actbio.2008.09.013.

Se entenderá que la descripción anterior de las modalidades preferidas se da solo a modo de ejemplo y que diversas modificaciones pueden realizarse por los expertos en la técnica. La especificación, ejemplos y datos anteriores proporcionan una descripción completa de la estructura y uso de modalidades ejemplares de la invención. Aunque varias modalidades de la invención se describieron anteriormente con un cierto grado de particularidad, o con referencia a una o más modalidades individuales, los expertos en la técnica podrían hacer numerosas modificaciones a las modalidades descritas sin apartarse del alcance de esta invención.

Ejemplo 1: Evaluación histológica de muestras dérmicas implantadas

La matriz de tejido acelular porcina STRATTICE™ se usó para producir matrices de tejidos que tienen agentes antimicrobianos catiónicos unidos. La matriz de tejido STRATTICE™ se obtuvo antes de la esterilización terminal y se procesó como sigue.

Primero, las soluciones de agente antimicrobiano se prepararon mediante el uso de clorhexidina (CHX) o nitrato de plata (AgNO₃). Las soluciones de CHX se prepararon mediante la disolución de 0,004 %, 0,02 %, o 0,1 % de CHX p/v en agua. Las soluciones de AgNO₃ se prepararon mediante la disolución de 0,001 %, 0,005 %, o 0,05 % de AgNO₃ p/v en agua. Las matrices de tejidos se incubaron en una de las soluciones identificadas anteriormente durante cuatro horas a temperatura ambiente. El agente antimicrobiano no unido se eliminó mediante lavado con solución salina. El tejido se empaquetó luego en bolsas de aluminio y se esterilizó terminalmente mediante el uso de radiación de haz de electrones.

Se produjeron dos tipos de controles. Primero, la matriz de tejido estándar STRATTICE™ se obtuvo de LifeCell Corporation y se usó como control sin procesar. En segundo lugar, las muestras de control se produjeron por incubación de la matriz de tejido en agua sola, es decir, sin agentes antimicrobianos presente.

Las matrices de tejidos procesadas y esterilizadas se cortaron en piezas de 1 cm² y se implantaron por subdérmicamente en la parte dorsal de ratas inmunocompetentes. Los explantes se recolectaron y se lavaron con PBS tanto al día 31 como al día 42. Los explantes se fijaron en 10 % de formalina, y los tejidos fijados se incrustaron en parafina. Las secciones de las muestras de matriz de tejido se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) mediante el uso de procedimientos estándar. D.C. Sheenan y B.B. Hrapchack, Theory and Practice of Histotechnology, 2da edición, Columbus, OH, Battelle Press (1987).

Los portaobjetos con muestras de histología teñidas con H&E de 31 días se evaluaron ciegamente por un histopatólogo en cuanto a la repoblación de fibroblastos, revascularización e inflamación. Estos parámetros se puntuaron mediante el uso de una escala de 0, 1, 2, o 3 (0 = ninguno, 1 = mínimo, 2 = moderado, 3 = significativo). La revascularización y repoblación de fibroblastos se consideran indicativas de las capacidades regenerativas de las matrices de tejidos acelulares. Por lo tanto, es deseable que cualquier medio de unión de un agente antimicrobiano a una matriz de tejido acelular no interfiera con estos procesos. En adición, generalmente es deseable preservar la respuesta del tejido regenerativa de las matrices de tejidos acelulares sin causar una inflamación significativa.

El análisis histopatológico de los explantes de 31 días se resume en la Figura 1. Todas las matrices de tejidos acelulares tratadas con nitrato de plata mostraron una revascularización y una repoblación de fibroblastos comparables a la del control. Las muestras tratadas con nitrato de plata, además, no dieron como resultado una inflamación significativa en comparación con el control. Similarmente, las matrices de tejidos acelulares tratadas con 0,004 % y 0,02 % de clorhexidina mostraron revascularización y repoblación de fibroblastos comparables a las del control sin inflamación significativa.

Además, se tomaron fotografías de explantes subdérmicos teñidos con H&E de 31 y 42 días con un aumento de 400 x mediante el uso de un microscopio. La Figura 2A muestra explantes subdérmicos teñidos con H&E de 31 días y 42 días preparados a partir de STRATTICE™ no tratado, de control y controles tratados con agua. Las puntuaciones de la repoblación de fibroblastos (Fibro), revascularización (Revas) e inflamación (Inflam) se indican cerca de cada imagen. Después de 31 días, los controles no tratados y tratados con agua mostraron una repoblación de fibroblastos significativa (Fibro=3), revascularización significativa (Reva=3), e inflamación moderada (Inflam=2).

La Figura 2B muestra explantes subdérmicos teñidos con H&E de 31 días y 42 días preparados mediante el uso de nitrato de plata y clorhexidina bajo un aumento de 400 x. Después de 31 días, el tejido tratado con nitrato de plata mostró una repoblación de fibroblastos significativa (Fibro=3), revascularización significativa (Revas=2,5), e inflamación mínima (Inflam=0,5). La muestra tratada con clorhexidina también mostró una revascularización y repoblación de fibroblastos con inflamación mínima (Fibro=3, Revas=2,5, Inflam=1).

En base a estos resultados, el método y las matrices de tejidos descritos preservan la funcionalidad del tejido acelular in vivo al permitir la revascularización y repoblación celular con una reacción inflamatoria mínima. Como se demuestra en las Figuras 1, 2A, y 2B, el tratamiento del tejido con un agente antimicrobiano de acuerdo con el método descrito no interfiere con la revascularización y repoblación de fibroblastos en comparación con el tejido de control. Además, la respuesta del tejido regenerativa se mantiene con una inflamación mínima en comparación con el control cuando se utiliza el método descrito.

Ejemplo 2: Ensayo de inhibición del crecimiento bacteriano in vitro

Se prepararon matrices de tejidos con propiedades antimicrobianas, según se describe en el Ejemplo 1, lo que dio como resultado tejidos tratados con 0,25 % de cloruro de bencetonio, 0,02 % de clorhexidina, 0,1 % de cloruro de benzalconio o 0,001 % de nitrato de plata preparados en agua. Los tejidos de control también se prepararon sin usar agentes antimicrobianos.

Las bacterias se prepararon para su uso en un ensayo de inhibición, mediante la inoculación de medio TSB (caldo de soja triptico) con *E. coli* o *S. aureus*. El medio inoculado se incubó después a 37 °C con agitación hasta que se alcanzó una población de $0,5-1 \times 10^9$ células/ml.

Tanto los tejidos antimicrobianos como los tejidos de control se enjuagaron en solución salina durante dos minutos antes de su uso en el ensayo de inhibición. Los tejidos se cortaron en piezas de 1,5 cm² y se secaron mediante el uso de una gasa estéril. Las piezas de tejido se colocaron después en placas TSA (agar de soja triptico).

Tanto el control como los tejidos antimicrobianos se inocularon individualmente con 1-2 ml de $0,5-1 \times 10^9$ células/ml de la solución bacteriana de *E. coli* o *S. aureus*, de manera que cada pieza se sembró con aproximadamente 1×10^6 células. Después de la inoculación, las placas de TSA se incubaron a 37 °C durante 20 horas. Después se adicionaron 10 ml de solución de IPTG/X-gal solamente a las placas inoculadas de *E. coli*. El sustrato X-gal se vuelve azul/verde cuando se escinde por la galactosidasa de *E. coli*, lo que permite una fácil visualización del crecimiento bacteriano. Las placas de *E. coli* se dejaron incubar durante 1-2 horas adicionales a 37 °C.

La efectividad de las matrices de tejidos para inhibir el crecimiento bacteriano se determinó después mediante observación visual. El crecimiento de *E. coli* dio como resultado colonias de color azul, mientras que el crecimiento de *S. aureus* resultó en colonias de color dorado. Se observó un crecimiento visible para ambos tipos de bacterias en las matrices de tejidos de control, es decir, sin antimicrobianos. No se observó crecimiento en las matrices de tejidos tratadas con cloruro de bencetonio, clorhexidina, cloruro de benzalconio, o nitrato de plata.

Los resultados del ensayo de inhibición bacteriana demuestran que los métodos y matrices de tejidos descritos dan como resultado que el crecimiento microbiano se reduce en comparación con el tejido de control sin antimicrobiano. Los resultados demuestran, además, que los métodos y matrices descritos son compatibles con una variedad de agentes antimicrobianos catiónicos y son efectivos contra una variedad de tipos de bacterias (por ejemplo, bacterias gram(-) y gram(+)).

Ejemplo 3: Evaluación de la estabilidad del agente antimicrobiano

Se prepararon matrices de tejidos antimicrobianas, como se describe en el Ejemplo 1, lo que dio como resultado tejidos tratados con cloruro de bencetonio, clorhexidina, cloruro de benzalconio o nitrato de plata preparados en agua en un intervalo de concentraciones (ver Figuras 3A y 3B para las concentraciones). Los tejidos de control también se prepararon sin usar agentes antimicrobianos.

Los tejidos se lavaron después en solución de PBS a 37 °C con agitación y cambios diarios de PBS durante 14 días. En la marca de 7 días y 14 días, se evaluó la actividad antimicrobiana de los tejidos lavados mediante el uso del mismo ensayo de inhibición del crecimiento bacteriano descrito en el Ejemplo 2 para *E. coli* y *S. aureus*. Una caída en la actividad antimicrobiana a lo largo del tiempo indicaría una falta de estabilidad en la interacción entre la matriz de tejido y el agente antimicrobiano ya que cualquier agente antimicrobiano unido se eliminó por lavado.

Los cambios en la actividad antimicrobiana a lo largo del tiempo se evaluaron, además, mediante la medición de unidades formadoras de colonias (CFU) en muestras de matriz de tejido. Para medir las CFU, el ensayo de inhibición del crecimiento bacteriano descrito en el Ejemplo 2 se realizó en matrices de tejidos tomadas al comienzo del período de lavado y en matrices de tejidos que se lavaron durante 7 o 14 días en PBS a 37 °C con cambios diarios de PBS. Las muestras del tiempo 0 no se lavaron. Las muestras lavadas se inocularon y cultivaron, como se describe en el

Ejemplo 2. Después del cultivo, las bacterias se extrajeron de las matrices de tejidos mediante la suspensión de cada matriz de tejido en 5 ml de PBS y la agitación vigorosa durante 5 minutos para extraer las bacterias. El extractante se diluyó en serie y se colocó en una placa de TSA. Las placas de TSA se incubaron después durante 24 horas a 37 °C. Al contar las colonias en las placas, se calcularon las CFU de cada pieza de tejido.

5 Los resultados según se determinaron por el crecimiento de *E. coli* y el crecimiento de *S. aureus* se presentan en las Figuras 3A y 3B, respectivamente. 0,25 % de cloruro de bencetonio, 0,02 % y 0,1 % de clorhexidina, 0,005 % y 0,05 % de nitrato de plata, y 0,1 % y 0,5 % de cloruro de benzalconio fueron efectivos para inhibir el crecimiento de *E. coli* después de 14 días. Se observaron resultados similares para *S. aureus*, que incluyen la efectividad de 0,5 % de cloruro de bencetonio en la inhibición del crecimiento de *S. aureus* después de 14 días de lavado.

10 Las Figuras 3A y 3B demuestran que el método descrito y las matrices de tejidos dan como resultado la preservación de la actividad antimicrobiana, incluso cuando la matriz de tejido se lava abundantemente durante 14 días. Como se muestra en este ejemplo, el método descrito y las matrices de tejidos dan como resultado la interacción estable entre
15 el agente antimicrobiano catiónico y la matriz de tejido acelular.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un agente antimicrobiano catiónico para usar en un método de tratamiento o prevención de infecciones asociadas con una matriz de tejido acelular dérmico que contiene colágeno implantada en o sobre el cuerpo de un paciente durante la cirugía, en donde el agente antimicrobiano catiónico se une establemente a la matriz por adsorción pasiva, en donde la matriz de tejido no se reticula durante la unión del agente antimicrobiano y en donde el agente antimicrobiano comprende al menos uno de cloruro de bencetonio, clorhexidina, cloruro de benzalconio, o nitrato de plata.
- 10 2. El agente antimicrobiano catiónico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la matriz de tejido comprende una matriz dérmica porcina.
- 15 3. El agente antimicrobiano catiónico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde la matriz de tejido retiene las propiedades antimicrobianas durante al menos dos semanas después de la implantación.

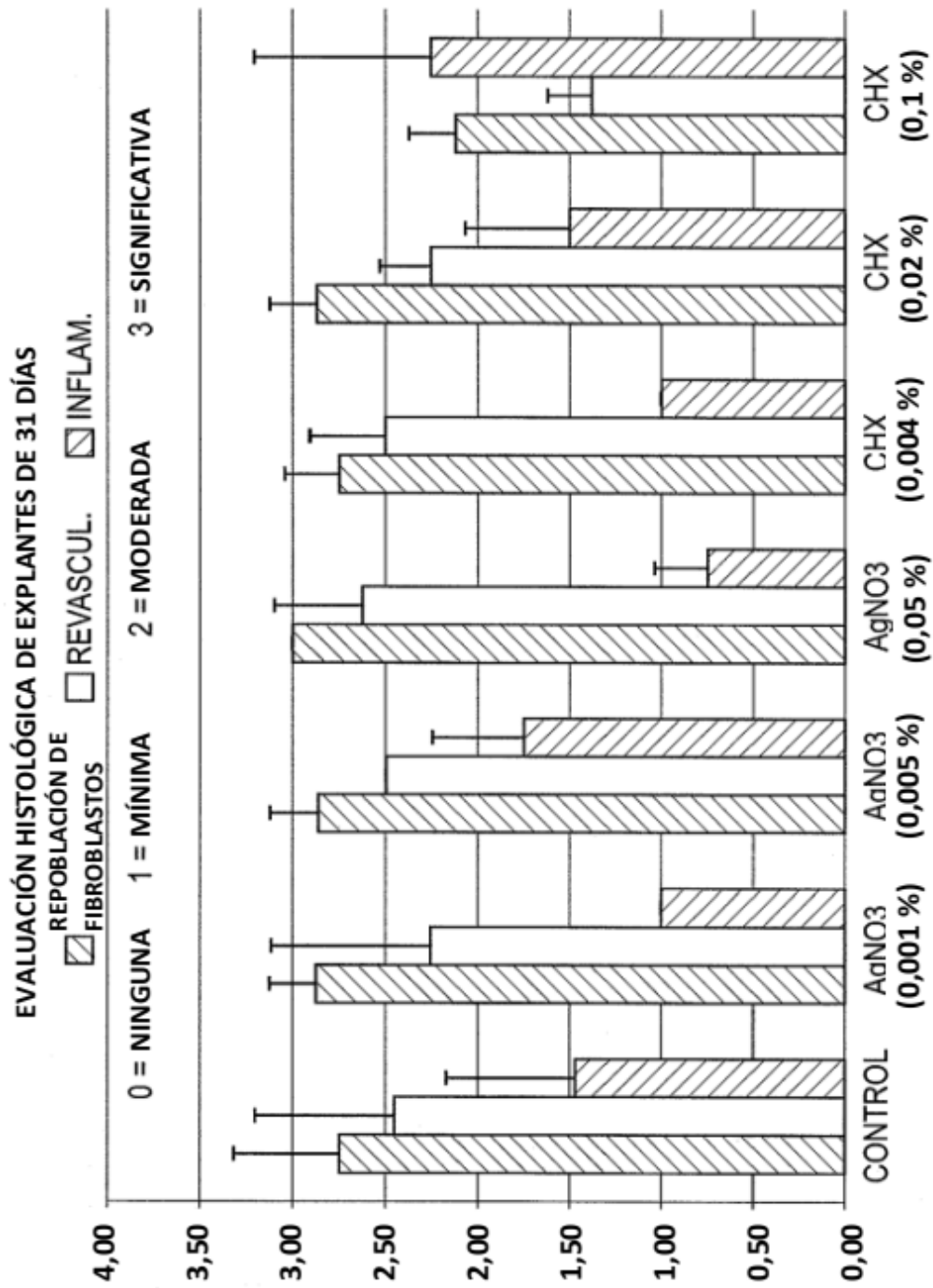


FIGURA 1

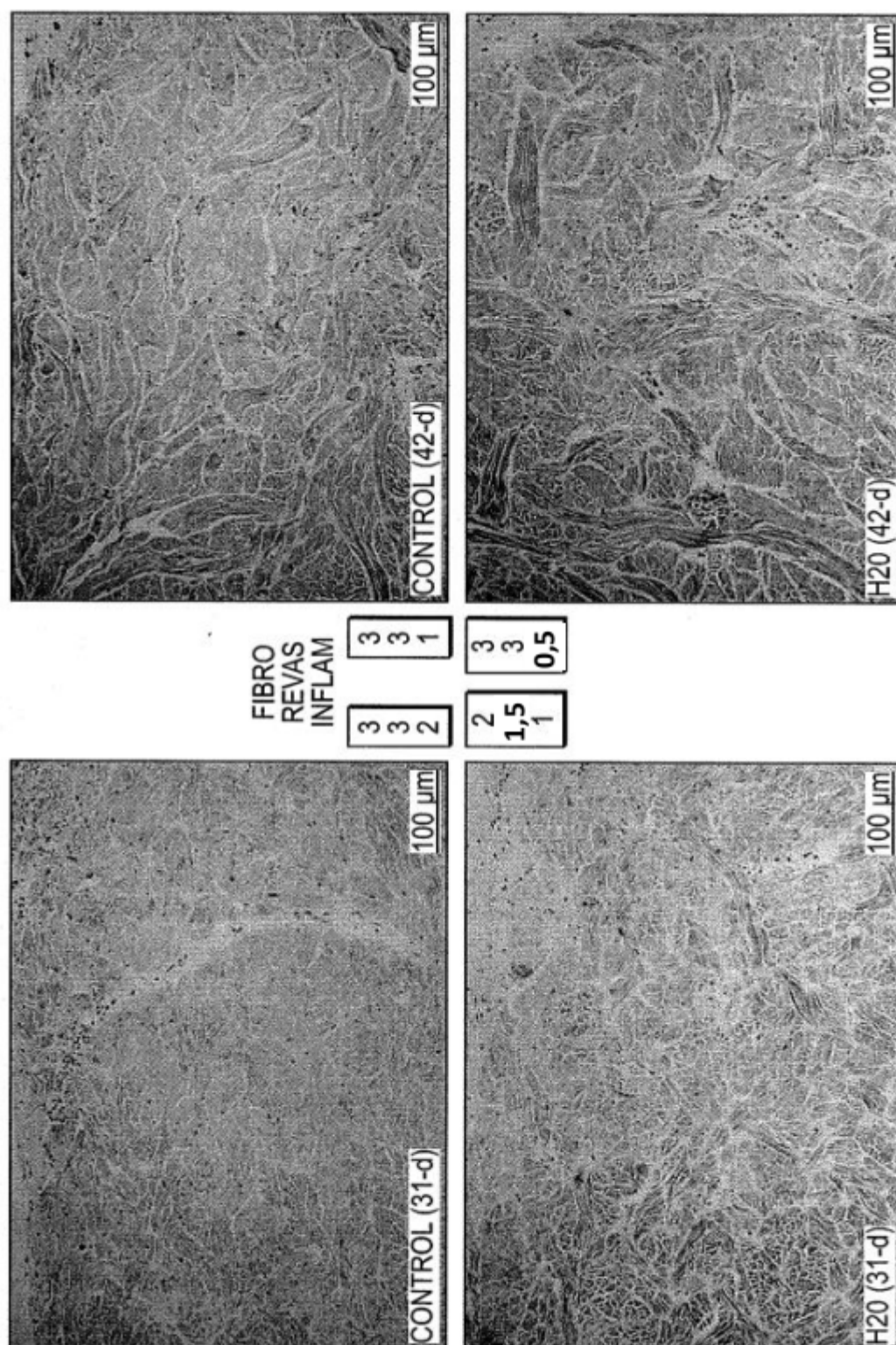


FIGURA 2A

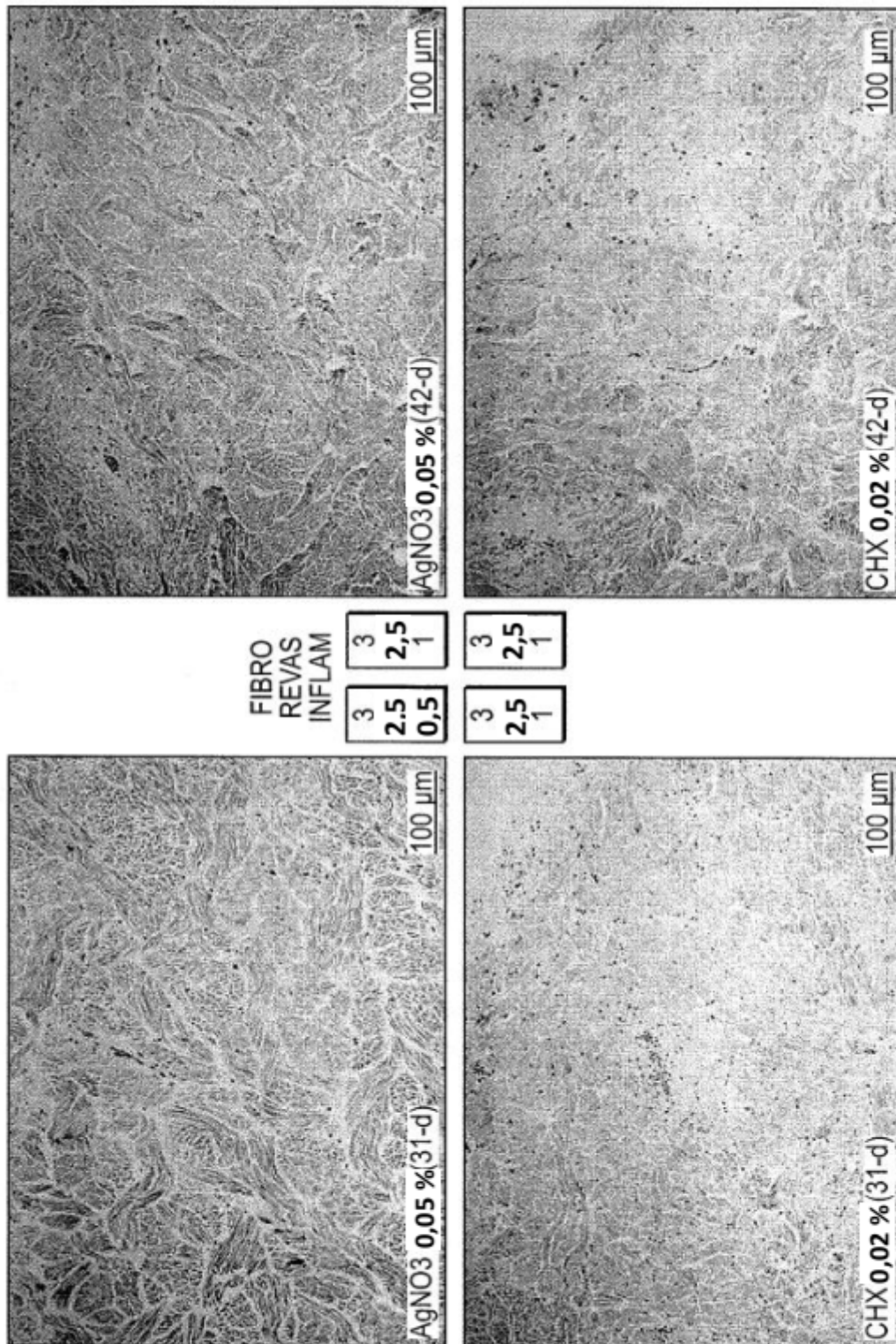


FIGURA 2B

CRECIMIENTO DE E.COLI EN TEJIDOS RECUBIERTOS

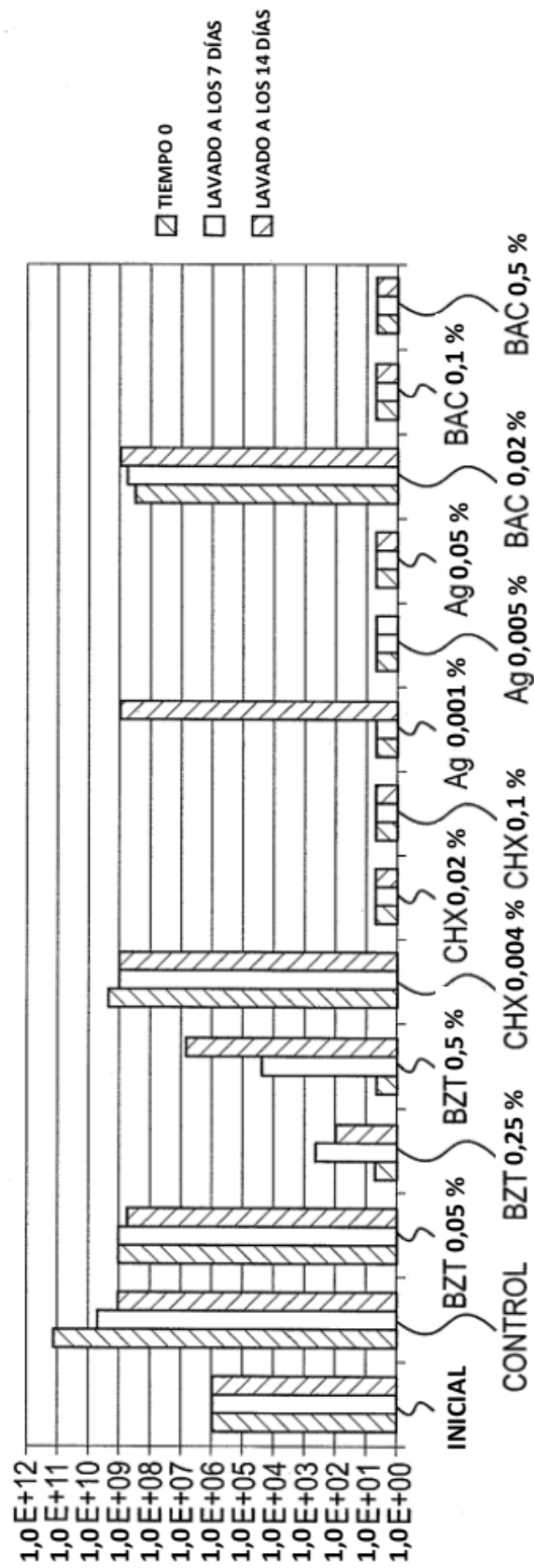


FIGURA 3A

CRECIMIENTO DE S.AUREUS EN TEJIDOS

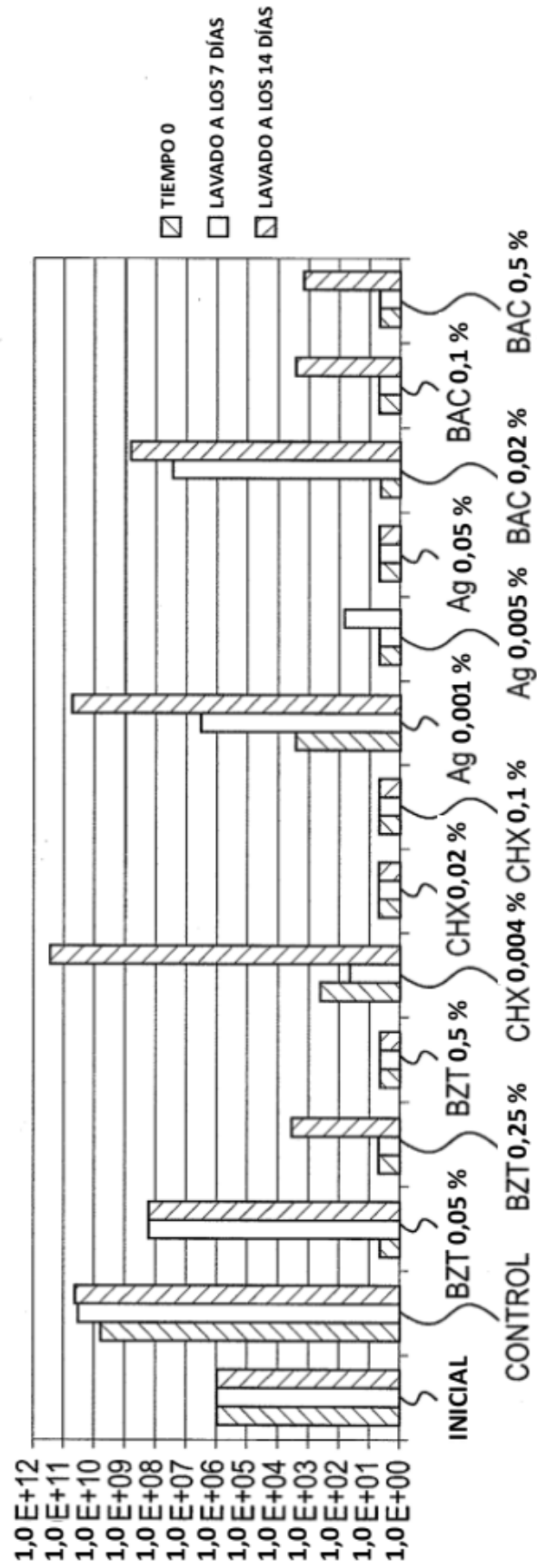


FIGURA 3B