

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 695 579**

51 Int. Cl.:

C12N 5/073 (2010.01)

A61L 27/36 (2006.01)

A61K 35/35 (2015.01)

A61K 35/36 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.12.2012 PCT/US2012/072027**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.07.2013 WO13102048**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2012 E 12862569 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018 EP 2798057**

54 Título: **Matriz de regeneración de tejido**

30 Prioridad:

30.12.2011 US 201161581803 P

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

09.01.2019

73 Titular/es:

**VIVEX BIOMEDICAL, INC. (100.0%)
3200 Windy Hill, Road Suite 1650W
Atlanta, GA 30339, US**

72 Inventor/es:

**MORRIS, PAUL R.;
KAST, NATHAN;
TEMPLE, H. THOMAS y
WOLFINBARGER, LLOYD**

74 Agente/Representante:

TORNER LASALLE, Elisabet

ES 2 695 579 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

Matriz de regeneración de tejido

Declaración en relación con la investigación y el desarrollo patrocinados federalmente

No aplicable.

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

La presente invención versa, en general, acerca del campo de matrices de tejido para una reparación regenerativa. Más en particular, la presente invención versa acerca de procedimientos para procesar tejidos para su uso en una reparación regenerativa de defectos de tejido blando y las matrices resultantes de tejido según se divulga en las reivindicaciones 1 y 10.

Descripción de la técnica relacionada

Cuando se produce un daño al tejido blando, se inicia una respuesta inflamatoria y se destinan células y factores moleculares al sitio de la lesión para comenzar el procedimiento de curación. Para que se produzca la curación, estas células deben poder infiltrar y proliferar en el área herida.

15 La proliferación celular en tejidos es controlada por agentes tanto positivos como negativos presentes en ese tejido. Los agentes positivos están presentes en el tejido para estimular una proliferación (agentes mitogénicos) y una diferenciación celulares (agentes morfogénicos). Hay presentes agentes negativos en el tejido para detener la proliferación celular y/o la diferenciación celular. Es este enfoque sensible y equilibrado para regular la actividad celular en tejidos que representa lo que, en ciertos casos, es una línea delgada entre un estado no neoplásico y uno neoplásico, o canceroso. La medicina regenerativa se ha convertido en una estrategia importante que implica el uso de materiales biológicos en la reparación de patologías tisulares cuando la expectativa de los aspectos regenerativos de la reparación es reducir las cantidades de formación de tejido cicatrizante fibroso que puede cerrar la patología, pero no participar adicionalmente en la función del tejido que está siendo regenerado. Por ejemplo, la patente US nº 7.851.447 describe un procedimiento para una reparación nervosa que comprende una o más enzimas degradantes del sulfato de condroitina proteoglicano (SCPG) (por ejemplo, condroitinasa ABC) que fomentan una penetración axonal en el tejido nervioso dañado.

El documento WO02/43778 da a conocer un procedimiento para la preparación de un tejido bioprotésico. El procedimiento incluye la eliminación de sitios de unión por fosfolípidos contenidos en un tejido biológico, de forma que se evite o inhiba que los agentes infecciosos u otras sustancias no deseadas se unan al tejido. El procedimiento comprende poner en contacto un tejido bioprotésico con un tensioactivo (por ejemplo, Tween 80) al igual que un agente desnaturalante, tal como una preparación de disolvente prótico (por ejemplo, etanol e isopropanol) que tiene una afinidad de unión hacia el agente infeccioso. Preferentemente, todos los fosfolípidos en un tejido son esencialmente eliminados. Dado que hay presentes proteoglicanos en los sitios de unión de agente infeccioso, el procedimiento elimina los sitios de unión que tienen tanto una proteína como un componente de polisacárido, tal como proteoglicano.

El documento US 2003/0087428 da a conocer un procedimiento para producir implantes de tejido blando acelular. El procedimiento incluye extraer una muestra de tejido blando con una solución que comprende detergentes no iónicos para producir tejido extraído, tratar el tejido extraído con una solución que comprende detergentes aniónicos, lavar el tejido tratado con una solución descontaminante para producir el injerto de tejido blando acelular; y almacenar el injerto de tejido blando acelular en una solución de almacenamiento que comprende agentes descontaminantes.

Además, las patentes U.S. nºs 7.008.763, 7.736.845 y 7.687.230 describen procedimientos para el tratamiento de tejidos conectivos colagenosos, siendo el objetivo de ese tejido que sea "rehabilitado" o "recolonizado" por células anfitrionas sin un rechazo inmunológico y una reacción inflamatoria. Describen un tejido empapado a temperaturas frías con poliglicol, sal, peróxido de hidrógeno y tampón fosfato con el objetivo de permitir que sustancias molidas se disocien de forma que las fibras de colágeno permanezcan estables. Como segunda solución de procesamiento, los tejidos son empapados en una solución de alcohol y de agua y/o en soluciones que comprenden agentes antiinflamatorios y antitrombogénicos.

Como otro ejemplo, muchos ataques cardíacos son el resultado de vasculatura ocluida y el daño isquémico resultante a los cardiomiocitos que comprenden el componente contráctil del corazón. Los esfuerzos por reparar este daño isquémico han sido variados, tales como esfuerzos que implican la siembra de células en las áreas dañadas isquémicamente con el objetivo de restaurar los cardiomiocitos funcionales. Por ejemplo, la patente U.S. nº 6.953.466 describe procedimientos para la administración de implantes terapéuticos a tejidos, incluyendo los agentes terapéuticos un factor de crecimiento endotelial vascular, un factor de crecimiento de fibroblastos, un factor de crecimiento derivado de plaquetas y angiopoyetinas. En este procedimiento particular, los agentes terapéuticos son administrados mediante un catéter alargado y depositando el vehículo y el agente terapéutico en el tejido. En la

patente U.S. nº 6.749.617 se describe un procedimiento similar; sin embargo, el procedimiento descrito en esta patente incluye el uso de un vehículo sólido o líquido de los agentes terapéuticos y los agentes terapéuticos incluyen células. En este procedimiento particular, el vehículo constituye un soporte para las células que se moverán desde ese soporte al tejido que está siendo reparado. En la patente U.S. nº 7.686.799 se describe un procedimiento para la administración de materiales celulares al músculo cardíaco, en el que se despliegan los materiales celulares directamente en la pared del músculo cardíaco. La patente U.S. nº 7.892.829 describe específicamente una regeneración del músculo cardíaco utilizando células madre mesenquimales. Estas células madre pueden ser administradas como un líquido inyectable o como una preparación de células en una matriz que es un sólido o semisólido, o llega a serlo.

5
10
15
20

Estos esfuerzos por reparar el músculo cardíaco dañado implican el uso de vehículos líquidos o sólidos de agentes terapéuticos y aunque estos agentes terapéuticos pueden incluir células; estos esfuerzos no dependen del uso de un procedimiento para preparar el músculo cardíaco dañado para que reciba células mediante un mecanismo de recrecimiento natural en el que se han eliminado o modificado los restos celulares muertos del daño isquémico al corazón de alguna forma para exponer restos moleculares que normalmente están presentes en una matriz colagenosa o en una matriz de tejido. El resultado ha sido, principalmente, la formación de tejido cicatrizante (un procedimiento de reparación), no la formación de músculo cardíaco funcional (un procedimiento de regeneración). Las tecnologías disponibles en la actualidad no llegan a abordar la presencia de agentes en el miocardio dañado que actuarán de una forma negativa hacia las células que son añadidas, de forma que las células sean dirigidas en un sistema de reparación que da lugar a una formación de tejido cicatrizante en vez de un sistema regenerativo que da lugar a la restauración de tejido muscular cardíaco funcional.

25
30
35

Existe un acervo considerable de bibliografía y de patentes pertinente a una eliminación de células de tejidos que han de ser utilizados clínicamente y mucho de este material se encuentra en una amplia categoría de descelularización de tejidos o de producir tejidos acelulares y/o avitales (que carecen de una población celular vital). De hecho, una de las primeras patentes que describen un procedimiento para la descelularización de tejidos fue de Brendel y Duhamel (patente U.S. nº 4.801.299) que implicaba el uso de detergentes no iónicos, soluciones hipotónicas, detergentes aniónicos, enzimas DNasa y RNasa e inhibidores de proteasas para la eliminación de células de tejidos. Véanse también las patentes U.S. nºs 4.539.716; 4.546.500; 4.835.102; 4.776.853; 5.558.875; 5.843.181; 4.776.853; y 5.843.180 para ejemplos de distintas estrategias para la descelularización de tejidos. La mayoría de estas estrategias de descelularización se centraban en la producción de tejidos descelularizados en los que el éxito quedó en evidencia por la falta de restos celulares visibles en preparaciones histológicas. De hecho, las patentes U.S. nºs 5.613.982; 5.632.778; 5.843.182; y 5.899.936 reivindicaron únicamente una reducción parcial en ácidos nucleicos extraíbles en tejidos descelularizados con poca evidencia de otros cambios en composiciones de lípidos, fosfolípidos y/o proteoglicanos. Se describió que tales tejidos se habían recelularizado tras su implantación en un paciente; sin embargo, los resultados iniciales indicaron una calcificación considerable de los tejidos sin indicar la causa o acciones correctivas necesarias con este procedimiento para descelularizar tejidos.

40

De forma similar, las patentes U.S. nºs 6.743.574, 6.432.712 y 7.179.287 describieron metodologías de descelularización que implicaban la eliminación de restos celulares hasta un nivel en el que la evidencia histológica de células no era visible en preparaciones histológicas. Desde entonces, los injertos de parche pulmonar procesados según la patente U.S. nº 6.743.574 han recibido aprobación por una notificación a la FDA previa a la comercialización, y se ha mostrado que tales tejidos se recelularizan *in situ* con poca indicación de complicaciones patológicas. Por lo tanto, se ha identificado provisionalmente un procesamiento específico de tejidos para eliminar elementos celulares de tejidos que proporciona tejidos adecuados para reparar defectos de tejido blando. Sin embargo, hasta la fecha no se han producido tales tejidos que contribuyan a una regeneración de tejidos blandos para producir materiales tisulares que sean funcionalmente equivalentes al tejido nativo en el que son implantados.

45
50

Una serie de patentes U.S. (patentes U.S. nºs 6.576.265; 6.893.666; 6.890.564; 6.890.563; 6.890.562; 6.887.495; 6.869.619; 6.861.074; 6.852.339; y 6.849.273) describen un procedimiento para producir un tejido conectivo desvitalizado para ser utilizado en una reparación y una regeneración de tejido. Sin embargo, solo se describe que el procedimiento utilizado para producir este tejido desvitalizado, en general, implica el uso de solución salina hipotónica y peróxidos. Además, no es suficiente simplemente descelularizar un tejido, ni es suficiente simplemente añadir agentes a un tejido procesado que actúen de una forma positiva para estimular la proliferación y la diferenciación celular.

55

Por lo tanto, el campo de medicina regenerativa sigue teniendo la necesidad de un tejido que sea eficaz en la regeneración, más que en la reparación, de tejidos blandos dañados, y procedimientos de creación del mismo. No es suficiente solo descelularizar un tejido, ni es suficiente solo añadir agentes a un tejido procesado que actúa de forma positiva para estimular la proliferación y la diferenciación celulares.

Sumario de la invención

La presente invención está dirigida a un procedimiento para la preparación de una matriz de tejido que sea adecuada para una reparación regenerativa de tejido blando, al igual que está dirigida a tal matriz de tejido y *kits* para la misma, según se describe en las reivindicaciones. La presente invención está dirigida a un procedimiento

- para la preparación de una matriz de tejido adecuada para una reparación regenerativa de tejidos que incluye etapas de aislar una porción de tejido conectivo para ser utilizada como la matriz de tejido, y poner en contacto el tejido conectivo con un tensioactivo y con un desinfectante. Esto tiene como resultado la reducción de los niveles de al menos uno de proteoglicanos, lípidos, fosfolípidos, ácidos nucleicos, antígenos de complejos principales de histocompatibilidad (CPH) (por ejemplo, CPH I o CPH II), microorganismos contaminantes y endotoxinas medidas. Aunque muchos de estos elementos están reducidos significativamente, tal como, en general, hasta un 90% o 99%, en general se retiene una cantidad sustancial de proteoglicanos extraíbles, tal como un 70% de proteoglicanos extraíble. El procedimiento tiene como resultado la producción de una matriz de tejido que facilita la recelularización y la reparación regenerativa en aplicaciones *in vitro* e *in vivo*.
- En algunas realizaciones, el procedimiento también incluye poner en contacto el tejido conectivo con una condroitinasa, un alcohol, una endonucleasa y/o una lipasa para reducir adicionalmente ciertos agentes inhibidores de la matriz de tejido conectivo. Además, el procedimiento puede incluir deshidratar y/o liofilizar la matriz de tejido resultante para su almacenamiento y/o transporte.
- En al menos una realización, el procedimiento de la presente invención incluye poner en contacto una porción aislada de tejido conectivo con una o más soluciones con capacidad para reducir los fosfolípidos, lípidos, proteoglicanos, ácidos nucleicos, antígenos de complejos principales de histocompatibilidad (CPH) I y II, microorganismos contaminantes y endotoxinas. La matriz resultante de tejido retiene señales moleculares apropiadas a la recelularización en aplicaciones *in vitro* e *in vivo*.
- La presente invención también está dirigida a una matriz de tejido producida por el presente procedimiento. La matriz de tejido de la presente invención es adecuada para ser utilizada en una reparación regenerativa de tejido blando. Tal matriz de tejido incluye una porción de soporte estructurada para proporcionar una forma a la matriz de tejido, y puede estar fabricada de proteoglicanos estructurales y tiene una estructura colagenosa. La matriz de tejido también incluye una porción no estructural dispuesta en una relación intercalada en al menos una porción de la porción de soporte o estructural, y que puede incluir proteoglicanos no estructurales. Las diversas porciones de la matriz de tejido están estructuradas colectivamente para fomentar la infiltración, la fijación y la proliferación celulares de células anfitrionas en la matriz tras una implantación o un trasplante tisular en un anfitrión. Por ejemplo, la matriz de tejido tiene niveles reducidos de fosfolípidos, lípidos, ácidos nucleicos, antígenos de complejos principales de histocompatibilidad (CPH) I y II, microorganismos contaminantes y endotoxinas, y, en cierta medida, proteoglicanos y, en algunas realizaciones, es al menos parcialmente acelularizada.
- La presente invención también está dirigida a *kits* para una reparación regenerativa de tejido blando que tienen al menos una matriz de tejido según se describe en la presente memoria para su implantación o uso, al igual que a *kits* para procesar tejido conectivo para producir una matriz resultante de tejido adecuada para una reparación regenerativa de tejido blando, incluyendo, al menos, una cantidad de tensioactivo y una cantidad de desinfectante.
- Los procedimientos, matrices de tejido y *kits* descritos en la presente memoria pueden ser utilizados en conexión con aplicaciones farmacéuticas, médicas y veterinarias, al igual que metodologías e investigaciones científicas fundamentales, según sería identificable por un experto tras la lectura de la presente divulgación.

Breve descripción de los dibujos

Para una comprensión más completa de la naturaleza de la presente invención, se debería hacer referencia a la siguiente descripción detallada tomada junto con las figuras adjuntas, en las que:

- La Figura 1 muestra una fijación y una proliferación de células L-929 en la matriz dérmica procesada a partir del donante UPS9571. Cuando fueron colocadas en placas a una densidad reducida (1000 células/muestra), las células L929 apenas fueron detectables en un instante temprano (datos no mostrados), pero formaron una buena capa de célula en ambos lados de las muestras tras 36 días (A, B, C, D). B y D: lado de la membrana fundamental. Barras de escala: 100 μm .
- La Figura 2 muestra la fijación de células L-929 en la matriz dérmica procesada a partir del donante UPS9238. Cuando fueron colocadas en placas a una mayor densidad (200000 células/muestra), las células L-929 fueron fácilmente observables tan solo 2 días después de la colocación en placas (A, B) y formaron una capa gruesa de células el día 5 (C, D). El día 22, fue observable (E, F, G, H) la infiltración de células en el tejido. Barras de escala: 100 μm .
- La Figura 3 muestra una fijación de células MIAMI patentadas en la dermis de matriz dérmica procesada a partir del donante UIN 9611. Cuando fueron colocadas en placas con una densidad reducida (10000 células/muestra), las células MIAMI fueron observables 35 días después de la colocación en placas (flechas negras A, B, C) tanto en la superficie como en el interior de la matriz dérmica. Barras de escala: 100 μm .
- La Figura 4 muestra ADN extraído de la matriz dérmica y cuantificado, comparando la matriz dérmica tratada con el procedimiento de la presente invención y un control no tratado. Se extrajo significativamente menos ADN de la

matriz dérmica tratada, indicando que el procedimiento de la presente invención es eficaz en la reducción de ácidos nucleicos en la matriz.

5 La Figura 5 muestra una curva de calibración de la señal de fluorescencia relacionada con el número de células viables.

La Figura 6 muestra la valoración de toxicidad de tejido de banda iliotibial.

10 La Figura 7 muestra la morfología de la célula L-929 al final de un ensayo de inhibición celular. Se hace notar que las células de control colocadas en placas a 20000 células por centímetro cúbico el día 1 fueron demasiado confluentes el día 3 (E). Barras de escala: 100 μ m.

15 La Figura 8 muestra la biocompatibilidad de matriz dérmica micronizada sembrada con células L-929, lo que indica una proliferación celular con el paso del tiempo.

La Figura 9 muestra una curva de calibración de la señal de fluorescencia relacionada con el número de células L-929 viables sembradas en la matriz dérmica micronizada, lo que indica que estas células siguen siendo viables.

20 La Figura 10 muestra la morfología de la célula L-929 durante el ensayo de biocompatibilidad el día 10. Las células parecían sanas y agregadas en la superficie de la dermis micronizada (A-C). Detalle a 200X (B). Control negativo: dermis micronizada UMTB 25-300 μ m (D).

25 La Figura 11 muestra la morfología de la célula L-929 durante el ensayo de biocompatibilidad el día 16. Las células parecían sanas y agregadas en la superficie de la dermis micronizada (A-C). Control negativo: dermis micronizada UMTB 25-300 μ m (D).

30 La Figura 12 muestra la morfología de la célula L-929 durante el ensayo de biocompatibilidad el día 30. Las células parecían sanas y agregadas en la superficie de la dermis micronizada (A-C). Control negativo: dermis micronizada UMTB 25-300 μ m (D).

35 La Figura 13 muestra la cicatrización de una herida en un primer paciente utilizando un injerto de matriz dérmica. El día 0 (A), se colocó un injerto de matriz dérmica de 4x4 cm en la herida. El día 12 (B), se observa el desarrollo del tejido de granulación por debajo de la pomada antibiótica, según se indica mediante la flecha. El día 40 (C), el tejido herido se ha regenerado casi por completo.

40 La Figura 14 muestra la cicatrización de una herida en un segundo paciente utilizando un injerto de matriz dérmica. El panel A muestra un injerto de herida dehiscente posterior a la radiación el día 1. El panel B muestra el día 2 posterior a la colocación del injerto. El panel C muestra el día 30 posterior a la colocación del injerto, cuando el tejido herido se ha regenerado casi por completo.

40 Descripción detallada

La presente invención está dirigida a procedimientos para el tratamiento de tejido conectivo para preparar una matriz de tejido adecuada para ser utilizada en una reparación regenerativa de tejido blando, al igual que tal matriz de tejido y *kits* para la misma.

45 A no ser que se defina lo contrario, se concibe que todos los términos de la técnica, las anotaciones y otros términos o terminología científicos utilizados en la presente memoria tengan los significados entendidos normalmente por los expertos en la técnica a la que pertenece la presente invención. En algunos casos, los términos con significados entendidos habitualmente se definen en la presente memoria en aras de la claridad y/o para una referencia inmediata, y no se debería interpretar necesariamente que la inclusión de tales definiciones en la presente memoria represente una diferencia sustancial sobre lo que se entiende generalmente en la técnica. Se comprenderá, además, que se debería interpretar que los términos, tales como los definidos en los diccionarios utilizados habitualmente, tienen un significado que es coherente con su significado en el contexto de la técnica relevante y/o según se definen de otra manera en la presente memoria.

50 La terminología utilizada en la presente memoria únicamente tiene el fin de describir realizaciones particulares y no se concibe que sea limitante de la invención. Según se utilizan en la presente memoria, se debería entender que los artículos indefinidos "un", "una", "el" y "la" incluyen una referencia plural a no ser que el contexto indique claramente lo contrario.

55 Según se utiliza en la presente memoria, se debería entender que la frase "y/o" significa "cualquiera o ambos" de los elementos así unidos, es decir, los elementos que están presentes de forma unida en algunos casos y presentes de forma no unida en otros casos.

Se debería entender que, según se utiliza en la presente memoria, “o” tiene el mismo significado que “y/o”, según se ha definido anteriormente. Por ejemplo, cuando se separa una lista de elementos, se debería interpretar que “y/o” u “o” es incluyente —es decir, la inclusión de al menos uno de un número de elementos—, pero que también incluye más de uno, y, opcionalmente, elementos no enumerados adicionales. Solo las expresiones que indiquen claramente lo contrario, tales como “únicamente uno de” o “exactamente uno de” o, cuando se utilice en las reivindicaciones, “que consiste en”, harán referencia a la inclusión de exactamente un elemento de un número o una lista de elementos. En general, solo se interpretará que el término “o”, según se utiliza en la presente memoria, indica alternativas excluyentes (es decir, “uno u otro, pero no ambos”) cuando sea precedido por expresiones de exclusividad, tales como “cualquiera”, “uno de”, “únicamente uno de” o “exactamente uno de”.

- 5
- 10 Según se utilizan en la presente memoria, se concibe que los términos “incluyendo”, “incluye”, “teniendo”, “tiene”, “con” o variantes de los mismos, sean incluyentes, de forma similar al término “comprendiendo”.

Como comprenderán los expertos en la técnica, los procedimientos, las matrices de tejido y los kits de la presente invención son aplicables a la reparación regenerativa de tejidos.

- 15 La presente invención está dirigida a un procedimiento para preparar una matriz de tejido adecuada para una reparación regenerativa de tejido blando. En al menos una realización, el procedimiento incluye el aislamiento de una porción de tejido conectivo para ser utilizado como la matriz de tejido. Se puede utilizar cualquier tejido conectivo apropiado, tal como, sin limitación, la dermis, la fascia, la piel, el pericardio, el periostio, un tendón, un ligamento, la dura, el epiplón, cartílago y combinaciones de los mismos. El tejido conectivo puede ser alógeno, autógeno o xenógeno, y puede aislarse de un cadáver o donante vivo. Los tejidos que han de ser procesados mediante los procedimientos de la presente memoria pueden ser obtenidos o recogidos en primer lugar de un donante humano o animal y colocados inmediatamente en una solución estabilizante de transporte que detiene y restringe la degradación autolítica y proteolítica, protege contra una contaminación bacteriana y fúngica, y reduce los daños mecánicos. La solución estabilizante contiene, en general, un tampón apropiado, uno o más antibióticos, y es transportada a las temperaturas de hielo húmedo. Ejemplos no limitantes de componentes de una solución estabilizante incluyen una solución fría (generalmente, aproximadamente 1 hasta aproximadamente 10 grados Celsius) de lactato de Ringer, bicarbonato sódico y antibióticos (por ejemplo, gentamicina, vancomicina, etc.).
- 20
- 25

- Una vez aislado, el procedimiento incluye las etapas de poner en contacto el tejido conectivo con al menos una solución con capacidad para reducir, de forma significativa, los elementos moleculares que son inhibidores del recrecimiento y de la proliferación celulares, que incluye al menos un componente seleccionado del grupo constituido por lípidos, fosfolípidos, ácidos nucleicos, antígenos de complejos principales de histocompatibilidad, endotoxinas y microorganismos contaminantes. También reducirá, al menos parcialmente, el contenido de proteoglicanos del tejido conectivo. En al menos una realización, el procedimiento incluye poner en contacto el tejido conectivo con un tensioactivo, tal como un detergente, al igual que poner en contacto el tejido conectivo con un desinfectante, descrito con mayor detalle de aquí en adelante.
- 30

- 35 Todas las soluciones utilizadas en el procedimiento de la invención reducirán el “contenido de proteoglicanos”. Según se utiliza en la presente memoria, “contenido de proteoglicanos” hace referencia a proteoglicanos estructurales, material blando de carga de proteoglicanos, condroitinas, hialuronanos, proteínas, polisacáridos, etc. Todas las etapas de procesamiento extraerán más fácilmente estos componentes que residen en los aspectos no estructurales del tejido, pero las etapas que incluyen desinfectantes, tales como ácido peracético, funcionarán igualmente bien sobre los proteoglicanos en los aspectos tanto estructural como no estructural (es decir, material blando de carga) del tejido. Sin embargo, en otras realizaciones, el procedimiento incluye poner en contacto un tejido con al menos una enzima condroitinasa, tal como, sin limitación, condroitinasa ABC, para reducir, de forma significativa, la presencia de proteoglicanos particulares, tales como sulfato de condroitina.
- 40

- 45 Los proteoglicanos contienen “condroitinas” enlazadas covalentemente. Los proteoglicanos que forman el aspecto estructural del tejido no son extraídos, en general, con facilidad mediante la presente invención, pero pueden ser modificados químicamente mediante la presente invención. Para proteoglicanos que no forman el aspecto estructural del tejido, la presente invención no solo servirá para extraer, sino para modificar químicamente, mediante oxidación, estos proteoglicanos al igual que las condroitinas no estructurales, hialuroninas y otras proteínas de menor peso molecular y polisacáridos y ácidos nucleicos de peso molecular elevado.

- 50 Los proteoglicanos extraíbles son principalmente condroitinas e hialuronanos asociados con proteínas no incorporadas aún en los aspectos estructurales del tejido (es decir, que residen en el aspecto “material blando de carga” del tejido). Se debería tener cuidado de no eliminar demasiado contenido de proteoglicanos. Los intervalos permisibles de eliminación de “proteoglicanos” extraíbles (es decir, condroitinas, hialuronanos, proteínas, etc.) en los que las máximas reducciones en “proteoglicanos” extraíbles no deberían ser superiores al 50%, ni inferiores al 30%.
- 55 Es necesaria una extracción suficiente de los “proteoglicanos” extraíbles para reducir el “material blando de carga” contenido en los elementos estructurales del tejido, de forma que las células puedan infiltrar la matriz de tejido, pero no tanto como para hacerla inadecuada a células que entran en la matriz de tejido. Como ilustración de este punto, la matriz extracelular de tejido es normalmente muy viscosa y una reducción nominal de esta viscosidad ayudará en un movimiento celular al entorno ahora menos viscoso, pero aún conservará una naturaleza física suficiente que las

células tengan una solución adyacente a sus membranas plasmáticas que evite que las moléculas que producen y secretan las células desaparezcan rápidamente de las mismas por difusión.

Como tal, el procedimiento puede tener como resultado la retención de una cantidad sustancial de proteoglicanos extraíbles, que ayuda a fomentar interacciones entre células y entre célula y matriz. El procedimiento tiene como resultado la producción de una matriz de tejido que facilita la recellularización y la reparación regenerativa en aplicaciones *in vitro* e *in vivo*. La retención de proteoglicanos, las proteínas de matriz tales como colágeno, laminina y elastina, al igual que la glucoproteína vitronectina son todas importantes en la unión celular y fomentan el remodelado del tejido. El procedimiento de preparación de la matriz de tejido reduce muchos componentes de la matriz extracelular (ECM) incluyendo glucosaminoglicanos (GAG), que están enlazados covalentemente con proteínas para formar proteoglicanos. Los GAG tales como hialuronano, sulfato de queratina y sulfato de heparina son un componente integral de la ECM y desempeñan un papel importante en las interacciones entre células y célula y matriz, y contribuyen a la migración y la diferenciación de células. Por lo tanto, en una realización preferente, la matriz de tejido retiene aproximadamente un 70% de proteoglicanos extraíbles.

Según se describe en toda la memoria, el procedimiento de la presente invención incluye etapas de poner en contacto el tejido conectivo con diversas soluciones. Según se utiliza en la presente memoria, "poner en contacto" puede incluir la aplicación de la solución a únicamente una porción del tejido conectivo, pero también puede incluir la inmersión del tejido conectivo en la solución, de forma que el tejido sea cubierto por completo de ese modo. En al menos una realización, la inmersión puede ser estática, en la que el tejido conectivo está cubierto por la solución y no es movido. En otras realizaciones, la inmersión es dinámica, lo que incluye cubrir con una solución, al igual que incluye oscilación, vibración, agitación, energía ultrasónica u otro movimiento o energía que se imparta sobre el tejido conectivo mientras está sumergido. Además, el procedimiento puede incluir enjuagar el tejido conectivo con una o más soluciones de enjuague o de limpieza, tales como solución salina, solución salina tamponada o agua, para enjuagar el tejido en diversas etapas en el procedimiento para eliminar cualquier solución utilizada anteriormente.

Las soluciones utilizadas en el procedimiento de la presente invención incluyen al menos un tensioactivo, tal como un detergente, y un desinfectante. Los tensioactivos descompondrán el contenido de lípidos y de fosfolípidos, y también tienen impacto molecular sobre las endotoxinas y los antígenos de CPH para ayudar también a reducirlos. Los tensioactivos y detergentes pueden ser aniónicos, no iónicos o catiónicos. Ejemplos de tensioactivos y/o detergentes útiles incluyen, sin limitación, detergente BRIJ 95, detergente BRIJ 96, detergente BRIJ 98, Triton X-100, Tween 20 y combinaciones de los mismos.

Los desinfectantes, y opcionalmente otros agentes biocidas, son utilizados en el presente procedimiento por más que únicamente su capacidad de matar microbios. Los desinfectantes son agentes muy nocivos, y reducirán significativamente los niveles de lípidos, fosfolípidos, ácidos nucleicos, antígenos de CPH, endotoxinas y microorganismos contaminantes del tejido conectivo que esté siendo tratado. Ejemplos de desinfectantes útiles en el presente procedimiento incluyen, sin limitación: ácido peracético, dióxido de cloro, peróxido de hidrógeno, yoduro de polivinilpirrolidina, formaldehído, glutaraldehído, fenoxietanol, metilparabeno, propilparabeno, hidroximetilglicinato de sodio, urea de diazolidinilo, DMDM hidantoína, butilcarbamato de yodopropinilo, propilenglicol y combinaciones de los mismos. En al menos una realización preferente, se utiliza ácido peracético como desinfectante. El ácido peracético es un potente desinfectante antibacteriano, antiviral y antifúngico.

La solución desinfectante de procesamiento, tal como ácido peracético, es la solución más eficaz reduciendo el contenido de ácido nucleico. En el caso del ácido peracético, esto puede ser debido, al menos en parte, a la capacidad oxidativa del ácido peracético para degradar el tamaño de los polímeros de ácido nucleico haciéndolos más solubles en una solución acuosa y más probable su difusión en el tejido durante el procesamiento. De las soluciones opcionales de procesamiento, las soluciones de reducción de endotoxinas son las más agresivas para reducir el contenido de ácido nucleico, y funcionan degradando los ácidos nucleicos hasta sus componentes de poco peso molecular, que se difundirán fácilmente del tejido durante todas las etapas subsiguientes de procesamiento. En algunas realizaciones, el procedimiento también incluye poner en contacto el tejido conectivo con una endonucleasa. Opcionalmente, se pueden utilizar una o más endonucleasas en algunas realizaciones tras cualquiera de las etapas de tratamiento con detergente o con ácido peracético. Por ejemplo, Benzonase®, OmniCleave™, Pulmozyme® (alfa domasa), y otras endonucleasas de amplio espectro son útiles en la presente invención para seleccionar como diana ácidos nucleicos para una destrucción.

La etapa desinfectante de los procedimientos descritos en la presente memoria también es la más eficaz reduciendo los antígenos de histocompatibilidad. Por ejemplo, en el caso del ácido peracético, la capacidad oxidativa de la solución de ácido peracético logra este resultado. Sin embargo, las condroitinasas tales como condroitinasa ABC también son muy eficaces, degradando enzimáticamente precisamente los polisacáridos de la superficie celular de los que están constituidos los antígenos CPH I y II.

La reducción de los ácidos nucleicos y de los antígenos de complejos principales de histocompatibilidad en las etapas de los procedimientos de la presente invención es útil en la reducción significativa de las respuestas inmunológicas, y posible rechazo del tejido, en un anfitrión que recibe la matriz procesada de tejido. Los ácidos

nucleicos que pueden ser reducidos incluyen ácidos desoxirribonucleicos, ácidos ribonucleicos y combinaciones de los mismos. Los derivados tanto de ácidos desoxirribonucleicos como de ácidos ribonucleicos pueden ser reducidos adicionalmente mediante los procedimientos implicados.

5 El desinfectante contribuye adicionalmente a la alteración de restos y de estructuras moleculares, tales como colágeno, y también actúa como un potente oxidante de elementos estructurales de la matriz extracelular (ECM) del tejido conectivo que está siendo tratado. Utilizando ácido peracético como ejemplo, el componente de ácido acético de ácido peracético altera la distribución de cargas de los polisacáridos sulfatados, lo que tiene como resultado una alteración de las estructuras moleculares de los elementos no estructurales (es decir, "material blando de carga") (por ejemplo, sulfatos de condroitina, sulfatos de dermatina, hialuroninas, tropocolágenos, etc.) y de los elementos
10 estructurales (por ejemplo, colágenos fibrosos, elastinas, proteoglicanos, etc.) de la matriz extracelular de tejidos. Las propiedades oxidativas del ácido peracético tienen como resultado la oxidación de grupos (por ejemplo, grupos alcohol a grupos aldehído, grupos amino a grupos nitrato, etc.) y la rotura de enlaces covalentes. Colectivamente, tales propiedades del ácido peracético ayudan a solubilizar los elementos no estructurales y también alterar/solubilizar las características estructurales de los elementos estructurales de tejidos.

15 Más específicamente, la oxidación de restos moleculares por las etapas de ácido peracético en la presente memoria (1) altera la naturaleza antigénica de los antígenos de complejos principales de histocompatibilidad modificando químicamente los azúcares de la parte de polisacárido de los antígenos de CPH I y II, (2) altera la distribución de cargas iónicas en las condroitinas y las hialuroninas facilitando su solubilización, (3) altera las interacciones
20 estructurales entre los proteoglicanos estructurales (contribuyendo, fundamentalmente, a enlaces cruzados intra e intermoleculares) haciendo los tejidos menos reabsorbibles tras la implantación y reforzándolos contra esfuerzos de tracción y deformaciones por tracción (haciéndolos más manejables para una manipulación y una aplicación clínica a un sitio de herida). Las reacciones oxidativas también sirven para (4) degradar los lípidos y fosfolípidos rompiendo las uniones en el enlace covalente de alcohol/fosfato del glicerol a un grupo fosfotidilacílico (o serina, etc.). La reacción oxidativa también (5) romperá los enlaces O-glucosídicos que enlazan los polisacáridos (condroitinas,
25 hialuroninas, etc.) con proteínas (es decir, descompone los proteoglicanos). Un aspecto de esta descomposición de proteoglicanos tiene que ver con la reducción de los componentes antígenos (la parte de polisacárido de los antígenos de CPH I y II en las membranas celulares) de los antígenos de complejos principales de histocompatibilidad, evitando, por lo tanto, una respuesta inflamatoria.

30 Por lo tanto, se puede reducir la viscosidad de los elementos del tejido blando, mejorando la solubilidad y su degradación formando moléculas más pequeñas, tanto mediante la alteración de los elementos no estructurales (es decir, los sulfatos de condroitina, sulfatos de dermatina, etc.) como alterando químicamente la distribución de cargas de esas moléculas no extraídas del tejido. El objetivo es reducir esta viscosidad del elemento de tejido blando y cambiar la estructura/naturaleza molecular de los elementos no estructurales, que cambiarán los restos moleculares que interactúan con los receptores de la superficie celular de las células que intentan fijarse, proliferar e infiltrarse en
35 el tejido, ya sea implantadas en el cuerpo o en condiciones de cultivo celular *in vitro*.

El grado o medida de oxidación de los restos moleculares en la matriz de tejido puede ser cuantificado como un porcentaje (o número de grupos oxidables por peso húmedo/seco unitario del tejido) de los restos moleculares oxidables originales utilizando concentraciones reducidas de un peróxido, pudiéndose determinar con precisión la
40 reducción de la o las concentraciones de peróxido utilizando ensayos estándar para peróxidos. Las propiedades mecánicas (por ejemplo, la resistencia a la tracción de suturas) de la matriz de tejido pueden determinarse utilizando metodologías estándar de ensayo mecánico de resistencia a la tracción.

A continuación, se proporcionan ejemplos no limitantes de algunas realizaciones de concentraciones y de tiempos de contacto. Se puede utilizar ácido peracético para su contacto en los procedimientos proporcionados como
45 soluciones al 0,05%, 0,1%, 0,5% durante 8 horas, 4 horas y 2 horas, respectivamente. Se puede utilizar BRIJ 95 para su contacto en los procedimientos proporcionado como soluciones al 0,25%, 0,5% y 1,0% durante 48 horas, 24 horas y 12 horas, respectivamente. De forma alternativa, se podría utilizar Triton X-100 en vez de BRIJ 95 como una solución al 0,25%, 0,5% o 1,0% para su contacto durante 48 horas, 24 horas y 12 horas, respectivamente. Se pueden utilizar alcoholes para su contacto como soluciones aproximadamente al 50% hasta aproximadamente al
50 85% durante aproximadamente 1-2 horas. Además, cuando se utiliza NaCl, puede utilizarse en soluciones de contacto a 1M durante 48 horas, 1,5M durante 24 horas o 2M durante 18 horas.

Los tejidos también pueden ser procesados asépticamente mediante soluciones de uno o más tipos de antibióticos, antivirales, antifúngicos o combinaciones de los mismos para reducir los microorganismos contaminantes. Ejemplos incluyen detergente, ácido peracético y/o alcohol. Esto hará negativo al tejido con respecto a microorganismos
55 contaminantes. De aquí en adelante se describen con más detalle los tiempos y las condiciones deseados utilizando las concentraciones deseadas de las soluciones de procesamiento para un tratamiento aséptico. Opcionalmente, se pueden retirar las soluciones de procesamiento entre las etapas de procesamiento utilizando solución salina, tal como solución salina tamponada con fosfato (PBS), 1,5M de NaCl y NaCl al 0,9%, o soluciones de enjuague con agua.

En algunas realizaciones, el procedimiento también incluye poner en contacto el tejido conectivo con una condroitinasa. Opcionalmente, se pueden utilizar enzimas condroitinasas en algunas realizaciones tras las etapas de tratamiento con detergente, para degradar uno o más proteoglicanos de sulfato de condroitina, que se pretende que inhiben el crecimiento axonal mediante un nervio aloinjertado procesado que se utiliza en la reparación de nervios cortados o dañados del sistema nervioso periférico. Un ejemplo de una enzima condroitinasa es la condroitinasa ABC, aunque se contemplan otras condroitinasas.

El procedimiento también puede incluir poner en contacto el tejido con una solución reductora de endotoxinas, haciendo negativo al tejido resultante con respecto a ensayos para endotoxinas. En algunas realizaciones, existen dos procedimientos que contribuyen a hacer a la matriz modificada negativa a las endotoxinas detectables. El primero es la oxidación y la degradación de la endotoxina de lipopolisacáridos (LPS). La dilución de la endotoxina mediante múltiples etapas de enjuague explica su reducción adicional. Tales etapas de enjuague pueden incluir una o más de los siguientes: una solución de ácido peracético al 0,1%, una solución de NaCl 1,5M, una solución de BRIJ 35 al 0,5% y combinaciones de las mismas. Los desinfectantes tales como el ácido peracético, al igual que las lipasas y condroitinasas también servirán para reducir los niveles de endotoxinas fundamentalmente eliminando los restos en las endotoxinas reconocidas por procedimientos de ensayo conocidos en la técnica y, al hacerlo, también reducirán el potencial de que cualquier endotoxina restante genere una respuesta inflamatoria cuando se implanten los tejidos.

En algunas realizaciones, el procedimiento también incluye poner en contacto el tejido conectivo con un alcohol. Por ejemplo, los alcoholes son útiles para contribuir adicionalmente a la descomposición de proteoglicanos, lípidos, fosfolípidos, ácidos nucleicos, antígenos de CPH, endotoxinas y microorganismos contaminantes. Ejemplos de alcoholes que pueden ser utilizados incluyen, sin limitación, etanol, propanol, isopropanol, butanol, glicerol, metanol, pentanol y combinaciones de los mismos. La etapa de tratamiento con alcohol permite una solubilización y una extracción modestas de fosfolípidos y de lípidos de los tejidos. Está bien establecido en la técnica que el etanol/isopropanol al 70% tiene una eficacia máxima en la solubilización de lípidos. Por lo tanto, es valioso como desinfectante para bacterias gram negativas, en las que los lípidos presentes en las paredes celulares bacterianas hacen tales microorganismos gram negativos más resistentes a ciertos antibióticos y agentes biocidas. De forma similar, las enzimas lipasa degradarán lípidos y la condroitinasa (por ejemplo, condroitinasa ABC) degradará condroitinas, con los que pueden asociarse íntimamente los lípidos y los fosfolípidos.

Los lípidos reducibles de los procedimientos descritos en la presente memoria incluyen lípidos no saponificables, o derivados de los mismos, incluyendo colesterol, derivados de colesterol y combinaciones de los mismos. Los fosfolípidos reducibles o derivados de los mismos incluyen diacilglicerofosfátidos, triacilglicéridos y combinaciones de los mismos. Los lípidos y fosfolípidos tienden a formar estructuras micelares en soluciones acuosas y, por lo tanto, tienden a cubrir restos moleculares que las células infiltrantes necesitarán "reconocer" (mediante sus receptores de la superficie celular); y, por lo tanto, es importante eliminar tanto contenido del lípido/fosfolípido como sea posible. En algunas realizaciones, el procedimiento también incluye, por lo tanto, poner en contacto el tejido conectivo con una lipasa, para aumentar la reducción de lípidos. Esto puede desearse cuando se tratan tejidos conectivos con un contenido elevado de lípidos y fosfolípidos, tales como tejidos dérmicos y, en particular, procesando tejidos dérmicos gruesos.

Una vez tratada, el procedimiento incluye deshidratar la matriz resultante de tejido para su almacenamiento y/o transporte. Por ejemplo, la matriz de tejido puede ser liofilizada, tal como mediante liofilización u otro procedimiento criogénico, para reducir el contenido de humedad residual de la matriz de tejido hasta entre aproximadamente un 2% y aproximadamente un 6%. Dado que tales tejidos pueden ser más quebradizos de lo deseado, en algunas realizaciones los tejidos pueden ser tratados en primer lugar con una solución al 10% hasta al 30% de glicerol durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que la solución de conservación o de almacenamiento sustituya el contenido de agua de los tejidos procesados, y luego liofilizados hasta un contenido de humedad residual de entre un 2% y un 6%. Tales tejidos serán menos quebradizos que tejidos similares que no son tratados de antemano con glicerol antes de la liofilización, y tales tejidos también son conservados mejor y protegidos mejor contra cualquier exposición subsiguiente a irradiación gamma utilizada en algunas etapas terminales de esterilización. Entonces, se puede almacenar la matriz de tejido en una solución de almacenamiento, que es, preferentemente, no acuosa, tal como aceite mineral o glicerol.

En algunas realizaciones, el tejido procesado puede ser dividido en trozos más pequeños a partir del estado hidratado, el liofilizado, el conservado hidratado o el conservado deshidratado. Esta división en trozos más pequeños puede llevarse a cabo mediante procedimientos estándar y medios establecidos conocidos por los expertos en la técnica, tales como utilizando fuerzas de cizallamiento en una mezcladora mecánica, fragmentación por impacto, criofractura y/o simple fragmentación mecánica utilizando un mortero y un triturador. En al menos una realización, la matriz de tejido es micronizada, lo que tiene como resultado una pluralidad de fragmentos o trozos que miden en el intervalo micrométrico. Por ejemplo, los trozos micronizados de tejido pueden tener un diámetro en el intervalo de 100 - 300 micrómetros, aunque algunos fragmentos pueden tener un diámetro medio inferior a 100 micrómetros. Esta matriz micronizada o fragmentada de tejido también puede proporcionarse en un estado congelado, en un estado deshidratado a temperatura ambiente, en un estado liofilizado o en un estado hidratado a temperatura ambiente. Esta matriz micronizada de tejido puede ser utilizada posteriormente como una matriz inyectable de tejido,

para una reparación regenerativa subcutánea, tal como para ser utilizada en aplicaciones cosméticas como único ejemplo ilustrativo.

Estas anteriores etapas tienen como resultado una modificación de la matriz de tejido suficiente para fomentar la infiltración y la proliferación celulares. Por ejemplo, el presente procedimiento implica la reducción de los niveles de al menos proteoglicanos, lípidos, fosfolípidos, ácidos nucleicos y antígenos de CPH. Según se ha expuesto en otro lugar en la presente memoria, los niveles de proteoglicanos se reducen en un intervalo de un 30% a un 50%, de forma que la matriz de tejido retenga un 50% hasta un 70% de proteoglicanos extraíbles. Los lípidos y fosfolípidos son reducidos en un intervalo de un 70% a un 95%. Los ácidos nucleicos son reducidos en un intervalo de un 30% a un 90%. Los antígenos del complejo principal de histocompatibilidad (CPH) I y II son reducidos en un intervalo de un 85% a un 99%. Además, las endotoxinas son eliminadas esencialmente de la matriz de tejido.

Estos resultados pueden ser evaluados comparando la capacidad de las células estándar de mamíferos para infiltrar los tejidos conectivos no procesados con respecto a tejidos conectivos procesados según la presente invención. La infiltración celular puede ser evaluada utilizando una evaluación histológica tradicional y/o extrayendo ácidos nucleicos de tejidos procesados y no procesados como una función del tiempo de incubación en presencia de una población de ensayo de células de mamíferos cultivadas en condiciones estándar de cultivo de tejido. Un aumento en los ácidos nucleicos extraíbles con el paso del tiempo es indicativo de una infiltración y una proliferación celulares. Los Ejemplos proporcionados de aquí en adelante demuestran la confirmación por algunos de estos ensayos.

La presente invención también está dirigida a una matriz de tejido adecuada para su uso en una reparación regenerativa de tejido blando, que puede ser un resultado del procedimiento descrito anteriormente en algunas realizaciones. Específicamente, la matriz de tejido de la presente invención comprende una porción de soporte estructurada para proporcionar una forma a la matriz de tejido. Por ejemplo, la porción de soporte puede estar fabricada de proteoglicanos estructurales o no extraíbles. En algunas realizaciones, la matriz está compuesta de una estructura colagenosa derivada de tejidos conectivos. La estructura colagenosa es adecuada para una infiltración celular, una fijación celular, una proliferación celular y una diferenciación celular en condiciones tanto *in vivo* como *in vitro*. La estructura colagenosa de la matriz de tejido puede poseer propiedades hemostáticas cuando se utiliza en condiciones tanto *in vivo* como *in vitro*.

La matriz de tejido también incluye una porción no estructural dispuesta en una relación intercalada en al menos una parte de la porción de soporte. Por ejemplo, la porción no estructural de la matriz de tejido es el componente de matriz extracelular (ECM) del tejido. Según se ha descrito anteriormente, empapa el soporte e incluye factores celulares y moleculares necesarios para una interacción entre células y célula y matriz que facilitan una infiltración, fijación y proliferación celulares. La porción no estructural de la matriz de tejido también puede estar compuesta de proteoglicanos, tales como proteoglicanos extraíbles y no extraíbles.

La porción de soporte y la porción no estructural de la matriz de tejido están estructuradas colectivamente para fomentar la infiltración, la fijación y la proliferación celulares de al menos una célula anfitriona en la matriz de tejido tras la implantación o el trasplante de la matriz de tejido en un tejido anfitrión que ha de ser reparado.

Además, la matriz de tejido puede retener restos moleculares asociados con moléculas que comprenden la estructura colagenosa apropiada para la fijación de células de mamíferos. En particular, la matriz de tejido está compuesta de tejido conectivo con una reducción significativa en al menos uno de lípidos, fosfolípidos, ácidos nucleicos, antígenos del complejo principal de histocompatibilidad, endotoxinas y algunos proteoglicanos. En consecuencia, al menos parte de la matriz de tejido, bien en la porción de soporte o bien en la porción no estructural, ha sido acelarizada, al menos parcialmente, mediante el procedimiento de eliminación de estos componentes. No obstante, la matriz de tejido retiene una cantidad significativa de proteoglicanos extraíbles. Preferentemente, la matriz de tejido retiene aproximadamente un 70% de proteoglicanos extraíbles.

En algunas realizaciones, la matriz de tejido también puede retener factores de crecimiento y de diferenciación derivados endógenamente. Tales factores de crecimiento y de diferenciación incluyen, sin limitación, factores angiogénicos, factores mitogénicos, factores morfogénicos y combinaciones de los mismos. Los factores angiogénicos incluyen, sin limitación, uno o más factores apropiados para la revascularización de una matriz de tejido en condiciones *in vivo* e *in vitro*. Asimismo, los factores mitogénicos incluyen, sin limitación, uno o más factores apropiados para la inducción de células a dividirse mitóticamente, proliferando y aumentando, de ese modo, en número. Los factores morfogénicos incluyen, sin limitación, uno o más factores apropiados para la inducción de células que infiltran la matriz de tejido para diferenciarse en fenotipos celulares adecuados para la formación de tejidos de estructura y función similares a los tejidos en los que se coloca la matriz de tejido.

En consecuencia, la matriz de tejido de la presente invención satisface uno o más de los siguientes criterios: (1) está reducida en al menos aproximadamente un 30%, y preferentemente más de aproximadamente un 90%, en ácidos nucleicos extraíbles; (2) está reducida en al menos aproximadamente un 70% hasta aproximadamente un 95% en fosfolípidos extraíbles; (3) está reducida en aproximadamente un 70% hasta aproximadamente un 95% en lípidos extraíbles; (4) retiene aproximadamente un 50% hasta aproximadamente un 70% de proteoglicanos extraíbles; (5) presenta restos moleculares que han sido oxidados; (6) está reducida en al menos aproximadamente un 85% en

antígenos inmunorreactivos de complejo principal de histocompatibilidad; (7) presenta una estructura colagenosa ligeramente alterada que ha sido disociada parcialmente por el ácido orgánico (preferentemente, ácido acético); (8) es desinfectada y es negativa en cultivo según valoraciones de esterilidad de la sección 71 USP; (9) es negativa (es decir, no detectable mediante procedimientos de ensayo utilizados por los expertos en la técnica o dentro de los límites permitidos en la actualidad por organismos reguladores) con respecto a niveles clínicamente aceptables de endotoxinas; (10) retiene restos moleculares asociados con la matriz de tejido colagenoso según sea apropiado para las necesidades de las células que infiltran la matriz de tejido y (11) facilita la infiltración, la fijación, la proliferación, la diferenciación celulares y la síntesis de materiales matriciales apropiados para la reparación regenerativa de defectos del tejido blando.

La presente invención también está dirigida a *kits* para una reparación regenerativa de tejido blando, que incluyen una matriz tisular de tejido conectivo aislado, según se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, tales *kits* incluyen una matriz de tejido que tiene niveles reducidos de al menos uno de proteoglicanos, lípidos, fosfolípidos, ácidos nucleicos, antígenos de complejo principal de histocompatibilidad (CPH) y endotoxinas. La matriz de tejido proporcionada por el *kit* está estructurada, por lo tanto, para fomentar la infiltración, fijación y proliferación celulares de las células anfitrionas en la misma. Además, los *kits* de la presente invención pueden incluir matrices de tejido de cualquier tipo de tejido, según se describe en la presente memoria, tales como, sin limitación, dermis y fascia. La matriz de tejido puede comprender cualquier estructura y dimensión apropiada adecuada para un fin particular de reparación, tal como, sin limitación, una capa, una capa gruesa (como entienden fácilmente las personas con un nivel normal de dominio de la técnica), una matriz fragmentada y/o micronizada, y que están listas para ser utilizadas en implantes.

En al menos una realización, el *kit* incluye, además, una cantidad de solución de transferencia, que ha de ser utilizada para facilitar o contribuir a la transferencia de la matriz de tejido a un anfitrión. Tal solución de transferencia puede ser cualquier solución biocompatible apropiada, tal como, sin limitación, solución salina, solución salina tamponada o agua. Además, se puede incluir instrumentación diversa en algunas realizaciones del *kit* para llevar a cabo la transferencia o la implantación de la matriz de tejido a un anfitrión. Por ejemplo, el *kit* puede incluir una aguja y al menos una jeringa en la que puede cargarse la matriz de tejido para una inyección subcutánea en el anfitrión. Esto es particularmente útil en conexión con una matriz micronizada de tejido, en la que la matriz micronizada de tejido puede estar suspendida en una solución de transferencia proporcionada en el *kit* e inyectada en el anfitrión. Se pueden incluir una pluralidad de jeringas y/o de agujas en el *kit* para inyecciones reiteradas. En algunas realizaciones, el *kit* está disponible con la jeringa precargada con la matriz de tejido y la solución de transferencia. En otras realizaciones, la matriz de tejido, la solución de transferencia y la jeringa están separadas en el *kit* y deben ser combinadas por un usuario.

La presente invención también está dirigida a *kits* para procesar tejido conectivo para producir una matriz resultante de tejido adecuada para una reparación regenerativa. Tales *kits* incluyen una cantidad de tensioactivo y una cantidad de desinfectante. Según se ha expuesto anteriormente, el tensioactivo puede ser un detergente, tal como BRIJ 95, BRIJ 96, Tween 20, Triton X100 u otros. El desinfectante puede ser ácido peracético, dióxido de cloro, peróxido de hidrógeno, yoduro de polivinilpirrolidina, formaldehído, glutaraldehído, fenoxietanol, metilparabeno, propilparabeno, hidroximetilglicinato de sodio, urea de diazolidinilo, DMDM hidantoína, butilcarbamato de yodopropinilo, propilenglicol y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, también se incluyen soluciones adicionales en el *kit*, tales como alcohol, condroitinasa, endonucleasa y lipasa y una solución reductora de endotoxinas, según se ha descrito anteriormente. Los *kits* también pueden incluir una solución de almacenamiento, preferentemente una solución no acuosa tal como aceite mineral, para almacenar la matriz resultante de tejido. Muchas realizaciones incluyen, además, instrucciones de uso.

Cualquiera de los *kits* descritos anteriormente también pueden incluir instrucciones para el uso del *kit*. Además, algunas realizaciones de los *kits* también pueden incluir al menos un reactivo de ensayo para ser utilizado en la detección de una reparación regenerativa y/o instrucciones para su uso. Estos reactivos están estructurados para su uso en la detección de al menos una de una infiltración, fijación, proliferación, diferenciación celulares y la síntesis de materiales de matriz apropiados para la reparación regenerativa de defectos de tejido blando. Los procedimientos de detección pueden incluir por conjugación de etiquetas o sustratos detectables, tales como compuestos fluorescentes, enzimas, radioisótopos, átomos pesados, genes indicadores, compuestos luminiscentes o anticuerpos contra componentes moleculares de la matriz de tejido. Como comprenderán los expertos en la técnica, se pueden utilizar metodologías adicionales de detección o de marcado en los *kits* proporcionados.

Sin una elaboración adicional, se cree que un experto en la técnica, utilizando la descripción precedente, puede utilizar la presente invención en su máximo grado. Se ofrecen los siguientes ejemplos a modo ilustrativo, no limitante. Aunque se han proporcionado ejemplos específicos, la anterior descripción es ilustrativa y no restrictiva. Se pueden combinar cualesquiera o más de las características de las realizaciones descritas anteriormente de cualquier forma con una o más características de cualquier otra realización en la presente invención. Además, serán evidentes muchas variaciones de la invención para los expertos en la técnica tras un repaso de la memoria.

Todas las publicaciones y los documentos de patente citados en la presente solicitud están incorporados por referencia en su parte pertinente para todos los fines en el mismo grado que si se denotase individualmente cada publicación o documento de patente individual. Por la cita de diversas referencias en el presente documento, los solicitantes no admiten que ninguna referencia particular sea "técnica anterior" a su invención.

5 Ejemplos

Los procedimientos y composiciones descritos en la presente memoria y los *kits* relacionados son ilustrados adicionalmente en los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo ilustrativo y no se pretende que sean limitantes. Se apreciará que serán evidentes para los expertos en la técnica y se encuentran dentro del alcance de las realizaciones de la presente invención variaciones en las proporciones y alternativas en elementos de los componentes mostrados. Se presentan aspectos teóricos con el entendimiento de que los solicitantes no buscan estar limitados por la teoría presentada. Todas las partes o cantidades, a no ser que se especifique lo contrario, son en peso.

Ejemplo 1: Procesamiento (A) de tejido cutáneo en la producción de un tejido de matriz dérmica.

1. Procedimiento

1.1 Preparación de tejidos conectivos cutáneos

1.1.1 Si ha sido congelado anteriormente en una solución de cloruro sódico 1,5 M, retirar del congelador el envase de piel envuelta, colocar un agitador orbital a 60 RPM, y permitir que la piel se descongele completamente durante 24 horas a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Si ha sido recién recuperada, proceder a procesar según se detalla a continuación. Si se convierte piel crioconservada en dermis descelularizada, retirar del congelador el envase de piel y colocarlo en una incubadora a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Después de la descongelación, retirar la piel del envase estéril y continuar con la sección 1.2.

1.2 Inspección, limpieza y pesaje de los tejidos

1.2.1 Utilizando técnicas asépticas, presentar los tejidos cutáneos al campo estéril.

1.2.2 Colocar cada trozo de piel con el lado epidérmico hacia arriba sobre una tabla para cortar.

1.2.3 Inspeccionar los tejidos cutáneos en busca de agujeros, lunares, verrugas y tatuajes y recortar estas áreas utilizando un bisturí.

1.2.4 Examinar los tejidos en busca de pelo y retirarlo con fórceps.

1.2.5 Enjuagar los tejidos limpiados colocándolos en una cubeta que contenga agua estéril.

1.2.6 Utilizando un bisturí, cortar con cuidado una muesca triangular pequeña aproximadamente 0,5 cm por debajo de la esquina superior izquierda del injerto.

1.2.7 Transferir los tejidos al interior de un recipiente estéril vacío y colocarlo asépticamente sobre la báscula de pesaje desinfectada de antemano. Determinar y registrar el peso total (peso de los tejidos y del recipiente) en el registro de procesamiento.

1.2.8 Transferir asépticamente los tejidos a un tarro estéril de plástico en el campo estéril dejando la cubeta sobre la báscula de pesaje. Determinar y registrar el peso de la cubeta vacía.

1.3 Enjuague de los tejidos

1.3.1 En función del peso del tejido determinado en la sección 1.2.8, determinar el volumen de solución salina normal libre de antibiótico que ha de utilizarse para una etapa de enjuague.

1.3.2 Añadir solución salina normal nueva libre de antibiótico (5 ml de solución salina por 1 gramo de piel) en el tarro estéril de plástico, cerrar el tarro con su tapa y agitar energicamente durante 15 segundos.

1.3.3 Retirar la tapa y decantar la solución.

1.3.4 Repetir la etapa de enjuague tres (3) veces.

NOTA: UTILIZAR EL VOLUMEN RECOMENDADO DE NUEVA SOLUCIÓN PARA CADA ENJUAGUE.

1.3.5 Después del último enjuague, decantar la solución.

- 1.4 Incubación con cloruro sódico
- 1.4.1 Transferir los tejidos cutáneos a un nuevo tarro estéril de plástico.
- 5 1.4.2 Verter la solución preparada anteriormente de cloruro sódico 1,5 M (5 ml por 1 gramo de piel o volumen de solución determinado en la etapa 1.3.1) en el tarro con piel y cerrar la tapa. Asegurarse de que todos los tejidos, incluyendo los sucedáneos, están completamente sumergidos en la solución.
- 10 1.4.3 Colocar en el agitador orbital/unidad de incubadora los tejidos cutáneos envueltos. Cerrar la tapa de la unidad.
- 1.4.4 Fijar la velocidad del agitador orbital a 60 RPM y permitir que los tejidos den vueltas e incubar a 37°C durante 18-24 horas.
- 15 1.5 Separación de la epidermis/dermis
- 1.5.1 Retirar de la incubadora/unidad agitadora los tejidos envueltos y desenvolver asépticamente el tarro.
- 20 1.5.2 Retirar la tapa del tarro y examinar los tejidos. Debería haber una separación evidente de las capas cutáneas epidérmica y dérmica.
- 1.5.3 Transferir un trozo de tejido cutáneo a una cubeta estéril nueva que contiene agua estéril.
- 25 1.5.4 Retirar la capa epidérmica.
- 1.5.5 Transferir el tejido cutáneo dérmico a una cubeta estéril nueva que contiene agua estéril.
- 30 1.5.6 Continuar este procedimiento hasta que se haya retirado la capa epidérmica de todos los trozos de tejido cutáneo dérmico.
- 1.5.7 Volver a pesar el tejido dérmico que ha de ser utilizado en el resto de la etapa de procesamiento.
- 1.6 Enjuague
- 35 1.6.1 Transferir los tejidos cutáneos a un tarro estéril de plástico.
- 1.6.2 Añadir agua estéril nueva (5 ml de solución salina por 1 gramo de piel) al tarro estéril de plástico, cerrar el tarro con su tapa y agitar enérgicamente durante 15 segundos.
- 40 1.6.3 Retirar la tapa y decantar la solución.
- 1.6.4 Repetir esta etapa de enjuague tres (3) veces.
- 45 1.6.5 Después del último enjuague, decantar la solución.
- 1.6.6 Colocar cubetas separadas en el campo estéril y etiquetar cada una con el grosor del tejido.
- 1.6.7 Verter solución salina normal estéril en cada cubeta.
- 50 1.6.8 Cortar tejidos en dimensiones especificadas utilizando un bisturí y una regla como guía y colocarlos en la cubeta respectiva. Mantener cada cubeta separada cuando prosigue cada etapa de procesamiento. Colocar todos los recortes de tejido cutáneo dérmico en el lado del campo estéril hasta que se hayan cortado todos los injertos.
- 55 1.6.9 Después de que se corta cada injerto, colocar un injerto cortado con el lado de la dermis hacia abajo y la membrana fundamental orientada hacia arriba. Utilizando un bisturí, cortar con cuidado una muesca triangular pequeña aproximadamente 0,5 cm por debajo de la esquina superior izquierda del injerto.
- 1.6.10 Colocar el injerto cortado con la muesca en la cubeta respectiva.
- 60 1.6.11 Repetir el procedimiento hasta que se hayan cortado todos los injertos con una muesca.
- 1.7 Incubación en detergente (por lote de tejido)
- 1.7.1 Colocar los injertos de tejido cutáneo dérmico en un nuevo recipiente estéril de plástico con tapa.

ES 2 695 579 T3

- 1.7.2 Verter la solución de BRIJ 35 al 0,5% (lauriléter de poli(oxietileno) (23), solución acuosa al 10%, calidad proteómica) (5 ml de solución por 1 gramo de piel) (G-Biosciences, Cat. nº: DG004) en el recipiente y cerrar la tapa. Asegurarse de que todos los tejidos están completamente sumergidos en la solución.
- 5 1.7.3 Colocar en el agitador orbital/unidad de incubadora los tejidos cutáneos envueltos. Cerrar la tapa de la unidad.
- 1.7.4 Fijar la velocidad del agitador orbital a 60 RPM y permitir que los tejidos den vueltas e incubar a 37°C durante 18-24 horas.
- 10 1.8 Preparar la solución (solución de ácido peracético al 0,1%)
- 1.9 Enjuague
- 15 1.9.1 Después de la incubación, retirar de la unidad de incubadora/agitador los tejidos envueltos y desenvolver asépticamente el tarro.
- 1.9.2 Retirar la tapa del tarro y decantar la solución de BRIJ 35 al 0,5%.
- 20 1.9.3 Añadir agua estéril (5 ml de solución por 1 gramo de piel) al recipiente y agitar enérgicamente durante 30 segundos.
- 1.9.4 Decantar la solución.
- 25 1.9.5 Repetir el procedimiento ocho (8) veces.
- 1.10 Desinfección
- 1.10.1 Transferir los injertos de tejido cutáneo dérmico a un nuevo recipiente estéril de plástico con tapa.
- 30 1.10.2 Verter solución de ácido peracético al 0,1% (5 ml por 1 gramo de piel) al interior del recipiente y cerrar la tapa. Asegurarse de que todos los tejidos están completamente sumergidos en la solución.
- 35 1.10.3 Colocar en el agitador orbital/unidad de incubadora los tejidos cutáneos envueltos. Cerrar la tapa de la unidad.
- 1.10.4 Fijar la velocidad del agitador orbital a 60 RPM y permitir que los tejidos den vueltas e incubar a 37°C durante 4 horas.
- 40 1.11 Enjuague
- 1.11.1 Después de la incubación, retirar de la unidad de incubadora/agitador los tejidos envueltos y desenvolver asépticamente el tarro.
- 45 1.11.2 Retirar la tapa del tarro y decantar la solución de ácido peracético al 0,1%.
- 1.11.3 Añadir agua estéril (5 ml de solución por 1 gramo de piel) al recipiente y agitar enérgicamente durante 30 segundos.
- 50 1.11.4 Decantar la solución.
- 1.11.5 Repetir el procedimiento ocho (8) veces.
- 55 1.12 Liofilización
- 1.12.1 Cargar los tejidos en el liofilizador.
- 1.12.2 Llevar a cabo el procedimiento de liofilización según los parámetros aplicables de liofilización - *Operation of the VirTis Freeze Dryers*.
- 60 1.12.3 Liofilizar los tejidos durante 2 a 10 días.

Ejemplo 2: Procesamiento (B) de piel para la producción de matriz dérmica.

2. Procedimiento

ES 2 695 579 T3

2.1 Preparación de tejidos conectivos cutáneos

5 2.1.1 Si ha sido congelado anteriormente en una solución de cloruro sódico 1,5 M, retirar del congelador el envase de piel envuelta, colocar un agitador orbital a 60 RPM, y permitir que la piel se descongele completamente durante 24 horas a 36°C ±1°C. NO DESPRECIAR EL ENVASE. Saltar a la sección 2.2

2.1.2 Si ha sido recuperado, proseguir al procesamiento según se detalla a continuación. Continuar con la sección 2.2

10 2.1.3 Si se convierte piel crioconservada en dermis descclularizada, retirar del congelador el envase de piel y colocarlo en una incubadora a 36°C ±1°C. Después de la descongelación, retirar la piel del envase estéril y continuar con la sección 2.2.

15 2.2 Inspección, limpieza y pesaje de los tejidos

2.2.1 Utilizando una técnica aséptica, presentar los tejidos cutáneos al campo estéril.

2.2.2 Colocar cada trozo de piel con el lado epidérmico hacia arriba sobre una tabla para cortar.

20 2.2.3 Inspeccionar los tejidos cutáneos en busca de agujeros, lunares, verrugas y tatuajes y recortar estas áreas utilizando un bisturí.

2.2.4 Examinar los tejidos en busca de pelo y retirarlo con fórceps.

25 2.2.5 Enjuagar los tejidos limpiados colocándolos en una cubeta que contenga agua estéril.

2.2.6 Utilizando un bisturí, cortar con cuidado una muesca triangular pequeña aproximadamente 0,5 cm por debajo de la esquina superior izquierda del injerto.

30 2.2.7 Transferir los tejidos a un recipiente estéril vacío y colocarlo asépticamente sobre la báscula de pesaje desinfectada de antemano. Determinar y registrar el peso total (peso de los tejidos y del recipiente) en el registro de procesamiento.

35 2.2.8 Transferir asépticamente los tejidos a un tarro estéril de plástico en el campo estéril dejando la cubeta sobre la báscula de pesaje. Determinar y registrar el peso de la cubeta vacía.

2.3 Enjuague de los tejidos

40 2.3.1 En función del peso del tejido determinado en la sección 2.2, determinar el volumen de solución salina normal libre de antibiótico que ha de utilizarse para una etapa de enjuague.

2.3.2 Añadir solución salina normal nueva libre de antibiótico (5 ml de solución salina por 1 gramo de piel) en el tarro estéril de plástico, cerrar el tarro con su tapa y agitar enérgicamente durante 15 segundos.

45 2.3.3 Retirar la tapa y decantar la solución.

2.3.4 Repetir la etapa de enjuague tres (3) veces.

50 **NOTA: UTILIZAR EL VOLUMEN RECOMENDADO DE NUEVA SOLUCIÓN PARA CADA ENJUAGUE.**

2.3.5 Después del último enjuague, decantar la solución.

2.4 Incubación con cloruro sódico

55 2.4.1 Transferir los tejidos cutáneos a un nuevo tarro estéril de plástico.

2.4.2 Verter la solución preparada anteriormente de cloruro sódico 1,5 M (5 ml por 1 gramo de piel o volumen de solución determinado en la etapa 2.3.1) en el tarro con piel y cerrar la tapa. Asegurarse de que todos los tejidos, incluyendo los sucedáneos, están completamente sumergidos en la solución.

60 2.4.3 Colocar en el agitador orbital/unidad de incubadora los tejidos cutáneos envueltos. Cerrar la tapa de la unidad.

65 2.4.4 Fijar la velocidad del agitador orbital a 60 RPM y permitir que los tejidos den vueltas e incubar a 37°C durante 18-24 horas.

2.5 Separación de la epidermis/dermis

2.5.1 Retirar de la incubadora/unidad agitadora los tejidos envueltos y desenvolver asépticamente el tarro.

5 2.5.2 Retirar la tapa del tarro y examinar los tejidos. Debería haber una separación evidente de las capas cutáneas epidérmica y dérmica.

2.5.3 Transferir un trozo de tejido cutáneo a una cubeta estéril nueva que contiene agua estéril.

10 2.5.4 Retirar la capa epidérmica.

2.5.5 Transferir el tejido cutáneo dérmico a una cubeta estéril nueva que contiene agua estéril.

15 2.5.6 Continuar este procedimiento hasta que se haya retirado la capa epidérmica de todos los trozos de tejido cutáneo dérmico.

2.5.7 Volver a pesar el tejido dérmico que ha de ser utilizado en el resto de la etapa de procesamiento.

2.6 Enjuague

20 2.6.1 Transferir los tejidos cutáneos a un tarro estéril de plástico.
2.6.2 Añadir agua estéril nueva (5 ml de solución salina por 1 gramo de piel) al tarro estéril de plástico, cerrar el tarro con su tapa y agitar enérgicamente durante 15 segundos.

25 2.6.3 Retirar la tapa y decantar la solución.

2.6.4 Repetir esta etapa de enjuague tres (3) veces.

30 2.6.5 Después del último enjuague, decantar la solución.

2.6.6 Colocar cubetas separadas en el campo estéril y etiquetar cada una con el grosor del tejido.

35 2.6.7 Verter solución salina normal estéril en cada cubeta.

2.6.8 Cortar tejidos en dimensiones especificadas utilizando un bisturí y una regla como guía y colocarlos en la cubeta respectiva. Mantener cada cubeta separada cuando prosigue cada etapa de procesamiento. Colocar todos los recortes de tejido cutáneo dérmico en el lado del campo estéril hasta que se hayan cortado todos los injertos.

40 2.6.9 Después de que se corta cada injerto, colocar un injerto cortado con el lado de la dermis hacia abajo y la membrana fundamental orientada hacia arriba. Utilizando un bisturí, cortar con cuidado una muesca triangular pequeña aproximadamente 0,5 cm por debajo de la esquina superior izquierda del injerto.

45 2.6.10 Colocar el injerto cortado con la muesca en la cubeta respectiva.

2.6.11 Repetir el procedimiento hasta que se hayan cortado todos los injertos con una muesca.

2.7 Incubación en detergente (por lote de tejido)

50 2.7.1 Colocar los injertos de tejido cutáneo dérmico en un nuevo recipiente estéril de plástico con tapa.

2.7.2 Verter la solución de BRIJ 35 al 0,5% (5 ml de solución por 1 gramo de piel) en el recipiente y cerrar la tapa. Asegurarse de que todos los tejidos están completamente sumergidos en la solución.

55 2.7.3 Colocar en el agitador orbital/unidad de incubadora los tejidos cutáneos envueltos. Cerrar la tapa de la unidad.

2.7.4 Fijar la velocidad del agitador orbital a 60 RPM y permitir que los tejidos den vueltas e incubar a 37°C durante 18-24 horas.

60

2.8 Incubar en condroitinasa ABC

2.8.1 Colocar los injertos de tejido cutáneo dérmico en un nuevo recipiente estéril de plástico con tapa

- 2.8.2 Verter la solución salina que contiene 100 unidades de condroitinasa ABC (5 ml de solución/1 gramo de tejido) en el recipiente y cerrar la tapa. Asegurarse de que todos los tejidos están completamente sumergidos en la solución.
- 5 2.8.3 Colocar en el agitador orbital y en la unidad de incubación el tejido envuelto. Cerrar la tapa de la unidad.
- 2.8.4 Fijar la velocidad del agitador orbital a 60 RPM y permitir que los tejidos den vueltas e incubar a 37°C durante 4-6 horas.
- 10 2.9 Preparar la solución (solución de ácido peracético al 0,1%) que ha de utilizarse el día 3.
- 2.10 Enjuague
- 15 2.10.1 Después de la incubación, retirar de la unidad de incubadora/agitador los tejidos envueltos y desenvolver asépticamente el tarro.
- 2.10.2 Retirar la tapa del tarro y decantar la solución de BRIJ 35 al 0,5%.
- 20 2.10.3 Añadir agua estéril (5 ml de solución por 1 gramo de piel) al recipiente y agitar enérgicamente durante 30 segundos.
- 2.10.4 Decantar la solución.
- 2.10.5 Repetir el procedimiento ocho (8) veces.
- 25 2.11 Desinfección
- 2.11.1 Transferir los injertos de tejido cutáneo dérmico a un nuevo recipiente estéril de plástico con tapa.
- 30 2.11.2 Verter solución de ácido peracético al 0,1% (5 ml por 1 gramo de piel) en el recipiente y cerrar la tapa. Asegurarse de que todos los tejidos están completamente sumergidos en la solución.
- 2.11.3 Colocar en el agitador orbital/unidad de incubadora los tejidos cutáneos envueltos. Cerrar la tapa de la unidad.
- 35 2.11.4 Fijar la velocidad del agitador orbital a 60 RPM y permitir que los tejidos den vueltas e incubar a 37°C durante 4 horas.
- 2.12 Enjuague
- 40 2.12.1 Después de la incubación, retirar de la unidad de incubadora/agitador los tejidos envueltos y desenvolver asépticamente el tarro.
- 2.12.2 Retirar la tapa del tarro y decantar la solución de ácido peracético al 0,1%.
- 45 2.12.3 Añadir agua estéril (5 ml de solución por 1 gramo de piel) al recipiente y agitar enérgicamente durante 30 segundos.
- 2.12.4 Decantar la solución.
- 50 2.12.5 Repetir el procedimiento ocho (8) veces.
- 2.13 Liofilización.
- 55 2.13.1 Cargar los tejidos en el liofilizador.
- 2.13.2 Llevar a cabo el procedimiento de liofilización según los parámetros aplicables de liofilización - *Operation of the VirTis Freeze Dryers*.
- 60 2.13.3 Liofilizar los tejidos durante 2 a 10 días.

Ejemplo 3: Preparación (A) de fascia para una matriz de tejido conectivo

Preparación de tejidos conectivos de fascia

2.1 Enjuague de los tejidos

ES 2 695 579 T3

En función del peso del tejido determinado en la sección 2.2, determinar el volumen de solución salina normal libre de antibiótico que ha de utilizarse para una etapa de enjuague.

2.1.1 Añadir solución salina normal nueva libre de antibiótico (5 ml de solución salina por 1 gramo de fascia) en el tarro estéril de plástico, cerrar el tarro con su tapa y agitar enérgicamente durante 15 segundos.

2.1.2 Retirar la tapa y decantar la solución.

2.1.3 Repetir la etapa de enjuague tres (3) veces.

NOTA: UTILIZAR EL VOLUMEN RECOMENDADO DE NUEVA SOLUCIÓN PARA CADA ENJUAGUE.

2.1.4 Después del último enjuague, decantar la solución.

2.2 Enjuague

2.2.1 Transferir los tejidos de fascia a un tarro estéril de plástico.

2.2.2 Añadir agua estéril nueva (5 ml de solución salina por 1 gramo de fascia) al tarro estéril de plástico, cerrar el tarro con su tapa y agitar enérgicamente durante 15 segundos.

2.2.3 Retirar la tapa y decantar la solución.

2.2.4 Repetir esta etapa de enjuague tres (3) veces.

2.2.5 Después del último enjuague, decantar la solución.

2.2.6 Colocar cubetas separadas en el campo estéril y etiquetar cada una con el grosor del tejido.

2.2.7 Verter solución salina normal estéril en cada cubeta.

2.2.8 Cortar tejidos en dimensiones especificadas utilizando un bisturí y una regla como guía y colocarlos en la cubeta respectiva. Mantener cada cubeta separada cuando prosigue cada etapa de procesamiento. Colocar todos los recortes de tejido de fascia en el lado del campo estéril hasta que se hayan cortado todos los injertos.

2.2.9 Después de que se corta cada injerto, colocar un injerto cortado con el lado inferior hacia abajo y la membrana superior orientada hacia arriba. Utilizando un bisturí, cortar con cuidado una muesca triangular pequeña aproximadamente 0,5 cm por debajo de la esquina superior izquierda del injerto.

2.2.10 Colocar el injerto cortado con la muesca en la cubeta respectiva.

2.2.11 Repetir el procedimiento hasta que se hayan cortado todos los injertos con una muesca.

2.3 Incubación en detergente (por lote de tejido)

2.3.1 Colocar los injertos de tejido de fascia en un nuevo recipiente estéril de plástico con tapa.

2.3.2 Verter la solución de BRIJ 35 al 0,5% (5 ml de solución por 1 gramo de piel) en el recipiente y cerrar la tapa. Asegurarse de que todos los tejidos están completamente sumergidos en la solución.

2.3.3 Colocar en el agitador orbital/unidad de incubadora los tejidos cutáneos envueltos. Cerrar la tapa de la unidad.

2.3.4 Fijar la velocidad del agitador orbital a 60 RPM y permitir que los tejidos den vueltas e incubar a 37°C durante 18-24 horas.

2.4 Incubar en condroitinasa ABC

2.4.1 Colocar los injertos de tejido en un nuevo recipiente estéril de plástico con tapa

2.4.2 Verter la solución salina que contiene 50 unidades de condroitinasa ABC (5 ml de solución/1 gramo de tejido) en el recipiente y cerrar la tapa. Asegurarse de que todos los tejidos están completamente sumergidos en la solución.

2.4.3 Colocar en el agitador orbital y en la unidad de incubación el tejido envuelto. Cerrar la tapa de la unidad.

2.4.4 Fijar la velocidad del agitador orbital a 60 RPM y permitir que los tejidos den vueltas e incubar a 37°C durante 4-6 horas.

2.5 Preparar la solución (solución de ácido peracético al 0,1%) que ha de utilizarse el día 3.

2.6 Enjuague

5 2.6.1 Después de la incubación, retirar de la unidad de incubadora/agitador los tejidos envueltos y desenvolver asépticamente el tarro.

2.6.2 Retirar la tapa del tarro y decantar la solución de condroitinasa.

10 2.6.3 Añadir agua estéril (5 ml de solución por 1 gramo de piel) al recipiente y agitar enérgicamente durante 30 segundos.

2.6.4 Decantar la solución.

15 2.6.5 Repetir el procedimiento ocho (8) veces.

2.7 Desinfección

2.7.1 Transferir los injertos de tejido a un nuevo recipiente estéril de plástico con tapa.

20 2.7.2 Verter solución de ácido peracético al 0,1% (5 ml por 1 gramo de piel) en el recipiente y cerrar la tapa. Asegurarse de que todos los tejidos están completamente sumergidos en la solución.

2.7.3 Colocar en el agitador orbital/unidad de incubadora los tejidos cutáneos envueltos. Cerrar la tapa de la unidad.

25 2.7.4 Fijar la velocidad del agitador orbital a 60 RPM y permitir que los tejidos den vueltas e incubar a 37°C durante 4 horas.

2.8 Enjuague

2.8.1 Después de la incubación, retirar de la unidad de incubadora/agitador los tejidos envueltos y desenvolver asépticamente el tarro.

30 2.8.2 Retirar la tapa del tarro y decantar la solución de ácido peracético al 0,1%.

2.8.3 Añadir agua estéril (5 ml de solución por 1 gramo de piel) al recipiente y agitar enérgicamente durante 30 segundos.

35 2.8.4 Decantar la solución.

2.8.5 Repetir el procedimiento ocho (8) veces.

2.9 Liofilización

40 2.9.1 Cargar los tejidos en el liofilizador.

2.9.2 Llevar a cabo el procedimiento de liofilización según los parámetros aplicables de liofilización - *Operation of the VirTis Freeze Dryers*.

2.9.3 Liofilizar los tejidos durante 2 a 10 días.

45 Ejemplo 4: Preparación (B) de una matriz de tejido conectivo de fascia

2.10 Preparación de tejidos conectivos de fascia

2.11 Enjuague de los tejidos

50 2.11.1 En función del peso del tejido determinado en la sección 2.2, determinar el volumen de solución salina normal libre de antibiótico que ha de utilizarse para una etapa de enjuague.

2.11.2 Añadir solución salina normal nueva libre de antibiótico (5 ml de solución salina por 1 gramo de fascia) en el tarro estéril de plástico, cerrar el tarro con su tapa y agitar enérgicamente durante 15 segundos.

55 2.11.3 Repetir la etapa de enjuague tres (3) veces.

- 2.11.4 Repetir la etapa de enjuague tres (3) veces.
- 2.11.5 Después del último enjuague, decantar la solución.
- 2.12 Enjuague
- 5 2.12.1 Transferir los tejidos de fascia a un tarro estéril de plástico.
- 2.12.2 Añadir agua estéril nueva (5 ml de solución salina por 1 gramo de fascia) al tarro estéril de plástico, cerrar el tarro con su tapa y agitar enérgicamente durante 15 segundos.
- 10 2.12.3 Retirar la tapa y decantar la solución.
- 2.12.4 Repetir esta etapa de enjuague tres (3) veces.
- 15 2.12.5 Después del último enjuague, decantar la solución.
- 2.12.6 Colocar cubetas separadas en el campo estéril y etiquetar cada una con el grosor del tejido.
- 2.12.7 Verter solución salina normal estéril en cada cubeta.
- 20 2.12.8 Cortar tejidos en dimensiones especificadas utilizando un bisturí y una regla como guía y colocarlos en la cubeta respectiva. Mantener cada cubeta separada cuando prosigue cada etapa de procesamiento. Colocar todos los recortes de tejido de fascia en el lado del campo estéril hasta que se hayan cortado todos los injertos.
- 25 2.12.9 Después de que se corta cada injerto, colocar un injerto cortado con el lado inferior hacia abajo y la membrana superior orientada hacia arriba. Utilizando un bisturí, cortar con cuidado una muesca triangular pequeña aproximadamente 0,5 cm por debajo de la esquina superior izquierda del injerto.
- 2.12.10 Colocar el injerto cortado con la muesca en la cubeta respectiva.
- 30 2.12.11 Repetir el procedimiento hasta que se hayan cortado todos los injertos con una muesca.
- 2.13 Incubación en detergente (por lote de tejido)
- 2.13.1 Colocar los injertos de tejido de fascia en un nuevo recipiente estéril de plástico con tapa.
- 35 2.13.2 Verter la solución de BRIJ 35 al 0,5% (5 ml de solución por 1 gramo de tejido) en el recipiente y cerrar la tapa. Asegurarse de que todos los tejidos están completamente sumergidos en la solución.
- 2.13.3 Colocar en el agitador orbital/unidad de incubadora los tejidos envueltos. Cerrar la tapa de la unidad.
- 40 2.13.4 Fijar la velocidad del agitador orbital a 60 RPM y permitir que los tejidos den vueltas e incubar a 37°C durante 18-24 horas.
- 2.14 Preparar la solución (solución de ácido peracético al 0,1%).
- 2.15 Enjuague
- 45 2.15.1 Después de la incubación, retirar de la unidad de incubadora/agitador los tejidos envueltos y desenvolver asépticamente el tarro.
- 2.15.2 Retirar la tapa del tarro y decantar la solución de detergente.
- 2.15.3 Añadir agua estéril (5 ml de solución por 1 gramo de tejido) al recipiente y agitar enérgicamente durante 30 segundos.
- 50 2.15.4 Decantar la solución.
- 2.15.5 Repetir el procedimiento ocho (8) veces.
- 2.16 Desinfección
- 55 2.16.1 Transferir los injertos de tejido a un nuevo recipiente estéril de plástico con tapa.
- 2.16.2 Verter solución de ácido peracético al 0,1% (5 ml por 1 gramo de tejido) en el recipiente y cerrar la tapa. Asegurarse de que todos los tejidos están completamente sumergidos en la solución.

2.16.3 Colocar en el agitador orbital/unidad de incubadora los tejidos envueltos. Cerrar la tapa de la unidad.

2.16.4 Fijar la velocidad del agitador orbital a 60 RPM y permitir que los tejidos den vueltas e incubar a 37°C durante 4 horas.

5 2.17 Enjuague

2.17.1 Después de la incubación, retirar de la unidad de incubadora/agitador los tejidos envueltos y desenvolver asépticamente el tarro.

10 2.17.2 Retirar la tapa del tarro y decantar la solución de ácido peracético al 0,1%.

2.17.3 Añadir agua estéril (5 ml de solución por 1 gramo de tejido) al recipiente y agitar enérgicamente durante 30 segundos.

15 2.17.4 Decantar la solución.

2.17.5 Repetir el procedimiento ocho (8) veces.

2.18 Liofilización

2.18.1 Cargar los tejidos en el liofilizador.

20 2.18.2 Llevar a cabo el procedimiento de liofilización según los parámetros aplicables de liofilización - *Operation of the VirTis Freeze Dryers*.

2.18.3 Liofilizar los tejidos durante 2 a 10 días.

Ejemplo 5: Preparación de una matriz de tejido pericárdico

25 2.19 Enjuague de los tejidos

2.19.1 En función del peso del tejido determinado en la sección 2.2, determinar el volumen de solución salina normal libre de antibiótico que ha de utilizarse para una etapa de enjuague.

30 2.19.2 Añadir solución salina normal nueva libre de antibiótico (5 ml de solución salina por 1 gramo de tejido) en el tarro estéril de plástico, cerrar el tarro con su tapa y agitar enérgicamente durante 15 segundos.

2.19.3 Retirar la tapa y decantar la solución.

35 2.19.4 Repetir la etapa de enjuague tres (3) veces.

2.19.5 Después del último enjuague, decantar la solución.

2.20 Enjuague

2.20.1 Transferir los tejidos a un tarro estéril de plástico.

40 2.20.2 Añadir agua estéril nueva (5 ml de solución salina por 1 gramo de tejido) al tarro estéril de plástico, cerrar el tarro con su tapa y agitar enérgicamente durante 15 segundos.

2.20.3 Retirar la tapa y decantar la solución.

45 2.20.4 Repetir esta etapa de enjuague tres (3) veces.

2.20.5 Después del último enjuague, decantar la solución.

2.20.6 Colocar cubetas separadas en el campo estéril y etiquetar cada una con el grosor del tejido.

50 2.20.7 Verter solución salina normal estéril en cada cubeta.

55 2.20.8 Cortar tejidos en dimensiones especificadas utilizando un bisturí y una regla como guía y colocarlos en la cubeta respectiva. Mantener cada cubeta separada cuando prosigue cada etapa de procesamiento. Colocar todos los recortes de tejido pericárdico en el lado del campo estéril hasta que se hayan cortado todos los injertos.

ES 2 695 579 T3

- 2.20.9 Después de que se corta cada injerto, colocar un injerto cortado con el lado inferior hacia abajo y la membrana superior orientada hacia arriba. Utilizando un bisturí, cortar con cuidado una muesca triangular pequeña aproximadamente 0,5 cm por debajo de la esquina superior izquierda del injerto.
- 5 2.20.10 Colocar el injerto cortado con la muesca en la cubeta respectiva.
- 2.20.11 Repetir el procedimiento hasta que se hayan cortado todos los injertos con una muesca.
- 2.21 Incubación en detergente (por lote de tejido)
- 2.21.1 Colocar los injertos de tejido en un nuevo recipiente estéril de plástico con tapa.
- 10 2.21.2 Verter la solución de BRIJ 35 al 0,5% (5 ml de solución por 1 gramo de tejido) en el recipiente y cerrar la tapa. Asegurarse de que todos los tejidos están completamente sumergidos en la solución.
- 2.21.3 Colocar en el agitador orbital/unidad de incubadora los tejidos cutáneos envueltos. Cerrar la tapa de la
- 15 unidad.
- 2.21.4 Fijar la velocidad del agitador orbital a 60 RPM y permitir que los tejidos den vueltas e incubar a 37°C durante 18-24 horas.
- 2.22 Incubar en condroitinasa ABC
- 20 2.22.1 Colocar los injertos de tejido en un nuevo recipiente estéril de plástico con tapa
- 2.22.2 Verter la solución salina que contiene 150 unidades de condroitinasa ABC (5 ml de solución/1 gramo de tejido) en el recipiente y cerrar la tapa. Asegurarse de que todos los tejidos están completamente sumergidos en la
- 25 solución.
- 2.22.3 Colocar en el agitador orbital y en la unidad de incubación el tejido envuelto. Cerrar la tapa de la unidad.
- 2.22.4 Fijar la velocidad del agitador orbital a 60 RPM y permitir que los tejidos den vueltas e incubar a 37°C durante 4-6 horas.
- 30 2.23 Preparar la solución (solución de ácido peracético al 0,1%).
- 2.24 Enjuague
- 2.24.1 Después de la incubación, retirar de la unidad de incubadora/agitador los tejidos envueltos y desenvolver
- 35 asépticamente el tarro.
- 2.24.2 Retirar la tapa del tarro y decantar la solución de condroitinasa.
- 2.24.3 Añadir agua estéril (5 ml de solución por 1 gramo de tejido) al recipiente y agitar enérgicamente durante 30 segundos.
- 40 2.24.4 Decantar la solución.
- 2.24.5 Repetir el procedimiento ocho (8) veces.
- 2.25 Desinfección
- 2.25.1 Transferir los injertos de tejido a un nuevo recipiente estéril de plástico con tapa.
- 45 2.25.2 Verter solución de ácido peracético al 0,1% (5 ml por 1 gramo de tejido) en el recipiente y cerrar la tapa. Asegurarse de que todos los tejidos están completamente sumergidos en la solución.
- 2.25.3 Colocar en el agitador orbital/unidad de incubadora los tejidos envueltos. Cerrar la tapa de la unidad.
- 50 2.25.4 Fijar la velocidad del agitador orbital a 60 RPM y permitir que los tejidos den vueltas e incubar a 37°C durante 4 horas.
- 2.26 Enjuague
- 2.26.1 Después de la incubación, retirar de la unidad de incubadora/agitador los tejidos envueltos y desenvolver
- 55 asépticamente el tarro.

2.26.2 Retirar la tapa del tarro y decantar la solución de ácido peracético al 0,1%.

2.26.3 Añadir agua estéril (5 ml de solución por 1 gramo de tejido) al recipiente y agitar enérgicamente durante 30 segundos.

5

2.26.4 Decantar la solución.

2.26.5 Repetir el procedimiento ocho (8) veces.

2.27 Liofilización

10

2.27.1 Cargar los tejidos en el liofilizador.

2.27.2 Llevar a cabo el procedimiento de liofilización según los parámetros aplicables de liofilización - *Operation of the VirTis Freeze Dryers*.

15

2.27.3 Liofilizar los tejidos durante 2 a 10 días.

Ejemplo 6: Infiltración celular sobre y en la matriz dérmica procesada.

20 Se prepararon mediante la unidad de procesamiento muestras liofilizadas de dermis utilizando un sacabocados de biopsia de 10 mm (Acuderm Inc., Ft. Lauderdale, EE.UU.). La biocompatibilidad fue evaluada mediante contacto directo de células L929 y MIAMI (línea celular patentada según se identifica y describe en la patente U.S. nº 7.807.458) con las muestras de matriz dérmica durante diversos periodos de tiempo. Se llevó a cabo un ensayo histológico cualitativo y los resultados fueron recogidos y documentados.

25 Se formuló la hipótesis de que las muestras de tejido que carecen de agentes que pueden ser citotóxicos para células de mamíferos y que presentan una estructura matricial que, a escala molecular y macroscópica, proporciona un entorno que es adecuado y apropiado para una fijación y proliferación celulares eran biocompatibles para la fijación y la proliferación celulares. Cuando se sometieron a ensayo tales tejidos de esta forma y se halló que son biocompatibles se adopta la firme premisa de que tales matrices de tejido tendrán capacidad regenerativa cuando sean utilizadas clínicamente en el tratamiento de patologías.

Materiales y procedimientos:

30 Todos los procedimientos fueron llevados a cabo en una cabina de flujo laminar diseñada para proporcionar un entorno estéril de trabajo. Se utilizaron herramientas y recipientes estériles.

Procedimiento experimental:

1) Se expandieron y utilizaron células L-929 o células MIAMI antes de alcanzar la confluencia.

35 2) Cada muestra de matriz dérmica fue transferida (membrana fundamental orientada hacia abajo) a pocillos individuales de placas de 24 pocillos (superficie de adherencia ultra baja, Corning, nº 3473) que contienen 500 µL de caldo de expansión de células L-929 o MIAMI.

40 3) Se recogieron y sembraron 10×10^3 o 200×10^3 células L929 o MIAMI directamente sobre la superficie de las muestras de tejido de matriz dérmica en los pocillos (volumen final de caldo/pocillos: 1000 pL). Se utilizaron muestras de matriz dérmica sin células como controles negativos.

45 4) Se incubaron las placas a 37°C y con un 5% de CO₂ en un oscilador (Rocker II, nº 260350, Boekel Scientific, 15 oscilaciones/min) y se recogieron muestras de tejido de matriz dérmica y fueron colocadas en formol (4% de CH₂O, 1% de metanol) para preparaciones histológicas en distintos días para proporcionar una comprensión del comportamiento de las células tras un contacto a corto, medio y largo plazo con la dermis.

5) Se llevaron a cabo una inclusión en parafina, corte y tinción con hematoxilina/eosina de las muestras según metodologías histológicas estándar.

Resultados:

50 Las preparaciones histológicas fueron examinadas y se tomaron imágenes digitales de secciones representativas con el objetivo de ilustrar la adherencia de las células bien L-929 o bien MIAMI sobre las superficies de las muestras de tejido de matriz dérmica, al igual que cualquier evidencia de proliferación celular.

55 Según se ilustra en las Figuras 1 y 2, la matriz dérmica soportó con facilidad la fijación celular y la proliferación celular de células L-929 (Figura 1 de un primer donante y Figura 2 de un segundo donante). Según se ilustra en la Figura 1, la colocación en placas de únicamente una densidad reducida de células (10000 células/muestra) parece

mostrar que las células L-929 proliferaron en contacto con la dermis, con únicamente pocas células observadas en instantes tempranos en comparación con la cantidad observada tras 36 días.

De forma similar, según se ilustra en la Figura 3, las células MIAMI menos robustas también sobrevivieron en contacto con la matriz dérmica.

- 5 Se vio que ambos tipos de células infiltraban el tejido, indicando, de ese modo, que la matriz dérmica era biocompatible y soporta con facilidad el crecimiento celular en una situación *in vitro*.

Ejemplo 7A: Reducción del ADN extraíble en muestras de matriz dérmica.

Se utilizó una extracción y una cuantificación del ADN de una matriz dérmica para reflejar la eficacia del procedimiento de descelularización.

- 10 Materiales y procedimientos:

El ADN fue cuantificado en:

- Dermis nueva, no procesada
- Dermis lavada, liofilizada

- 15 Nota: todos los materiales que hicieron contacto con las muestras eran estériles para evitar una contaminación exógena del ADN. Se utilizó el kit (QIAamp DNA Mini, Qiagen, nº 51304) de extracción de ADN según las instrucciones del fabricante, con las modificaciones según se describen en el siguiente procedimiento. Cada etapa relacionada con el kit fue llevada a cabo a temperatura ambiente.

- 20 1) Se pesaron las muestras de dermis y se transfirieron aproximadamente 10 mg a tubos estériles de microcentrifugadora de 2 ml (eppendorfs®). Se registró el peso exacto en el cuaderno del laboratorio. Para las muestras no lavadas se utilizaron 1,5 mg.

- 25 2) Se ajustó el volumen del tampón de lisis tisular (tampón ATL) por muestra según su peso (360 µl de tampón de lisis/5 mg, y 360 µl/1,5 mg).

- 3) El volumen de proteinasa K por muestra fue ajustado según su peso (40 µ de proteinasa K/5 mg de muestra y mismo volumen para 1,5 mg), fue añadido y mezclado mediante centrifugación con impulsos durante 15 seg.

- 30 4) Las muestras fueron incubadas a 56°C durante 20 h hasta que fueron lisadas completamente.

- 5) Se colocaron 400 µl de cada muestra en un nuevo tubo eppendorf y se añadieron 8 µl de RNasa A (100 mg/ml), mezclados mediante centrifugación con impulsos durante 15 seg e incubados durante 2 min a temperatura ambiente.

- 35 6) Se añadieron 400 µl de tampón de lisis (tampón AL) y fueron mezclados mediante centrifugación con impulsos durante 15 seg.

- 7) Se incubaron las muestras a 70°C durante 10 min.

- 40 8) Se añadieron 400 µl de etanol (100%) y fueron mezclados mediante centrifugación con impulsos durante 15 seg.

- 9) Se transfirieron la mitad de los lisados (600 µl) a las columnas QIAamp MinElute.

- 45 10) Las columnas fueron centrifugadas a 6000g durante 1 min.

- 11) Se colocaron las columnas en tubos limpios de toma de muestras de 2 ml. Se repitieron las etapas 9, 10 y 11 con la otra mitad del lisado en la misma columna.

- 50 12) Se añadieron 500 µl de tampón de lavado (tampón AW1) a las columnas y fueron centrifugadas a 6000g durante 1 min.

- 13) Se colocaron las columnas en tubos limpios de toma de muestras de 2 ml.

- 55 14) Se repitieron las etapas 12 y 13.

- 15) Se añadieron 500 µl de tampón de lavado (tampón AW2) y fueron incubados durante 2 min antes del centrifugado a 18.000g durante 1 min.

16) Se colocaron las columnas en tubos limpios de toma de muestras de 2 ml.

17) Se añadieron 500 µl de tampón de lavado (tampón AW2) y fueron incubados durante 2 min antes del centrifugado a 18.000g durante 3 min.

18) Se colocaron las columnas en tubos limpios de toma de muestras de 2 ml.

19) Se centrifugó la columna a 18.000g durante 1 min para secar la membrana.

20) Se colocaron las columnas en tubos limpios de toma de muestras de 2 ml.

21) Se aplicaron 100 µl de tampón TE en el centro de la columna y fueron incubados a temperatura ambiente (15-25°C) durante 5 min.

22) Se centrifugaron las columnas a 6000g durante 1 min.

23) Se colocaron las columnas en otro tubo limpio de microcentrifugadora.

24) Se repitieron las etapas 21-23 dos veces.

25) Las muestras fueron centrifugadas y luego se determinó la concentración de ADN utilizando un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Fischer Scientific). El instrumento fue inicializado utilizando agua y dejado virgen utilizando tampón TE.

Resultados:

Se determinó la cantidad de ADN extraído de cada muestra dérmica, proporcionando los resultados mostrados a continuación:

Tabla 1

Donantes/nº SCI	Condiciones de procesamiento	Condiciones de lavado	Peso inicial (mg)	Peso final (mg)	µg de ADN/mg de producto
UPS11182-12	Dermis. No procesada, control	No lavada	7,8	1,5	0,83
UPS111140024	Dermis. No procesada	No lavada	10,45	1,5	0,66
UPS11182-12	Dermis. No micronizada, FD	Lavada	11,67	10	0,085

Tabla 2

ID del donante	Tipo de muestra	µg de ADN/mg de tejido
UPS11182-12	Dermis nueva, no procesada	0,827
UPS11182-12	Dermis, procesada (SOP 25-009 02)	0,085

Conclusión:

Se analizaron dos muestras nuevas no procesadas de dermis de distintos donantes. Ambas tenían contenidos similares de ADN (0,83 y 0,66 µg de ADN/mg de tejido). Las muestras de dermis fueron procesadas según el procedimiento de la presente invención, tal como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1. Esta muestra de dermis analizada tenía un 90% menos de ADN que la muestra nueva no procesada del mismo donante (0,085 y 0,83 µg de ADN/mg de tejido, respectivamente). Esto se muestra en las anteriores Tablas 1 y 2 y se muestra en el gráfico de la Figura 4.

Ejemplo 7B: Efectos del detergente y del ácido peracético en la reducción de ADN extraíble en muestras de matriz dérmica.

Se prepararon muestras de matriz dérmica mediante la unidad de procesamiento utilizando un sacabocados de biopsia de 10 mm (Acuderm Inc., Ft. Lauderdale, EE. UU.). Se cuantificó el ADN en las muestras tomadas en etapas de procesamiento previo al detergente, de procesamiento posterior al detergente y de procesamiento posterior al ácido peracético. Se analizaron varios donantes durante estas 2 etapas. Se utilizaron cinco muestras de cada donante individual para promediar los resultados:

ES 2 695 579 T3

Procedimiento de extracción de ADN:

- 1) Las muestras recogidas de la sala de procesamiento fueron congeladas instantáneamente en nitrógeno líquido para evitar la degradación del ADN.
- 5 2) Descongelar lentamente las muestras sobre hielo.
- 3) Se eliminó el exceso de agua de las muestras colocándolas sobre papel secante estéril durante 2-3 minutos. Nota: todos los materiales que hacían contacto con las muestras son estériles y evitan una contaminación exógena del ADN.
- 10 4) Se escindieron submuestras con un peso aproximado de 12,5 mg de cada muestra y fueron transferidas a tubos estériles de microcentrifugadora (Eppendorf®). Se registró el peso exacto en el cuaderno del laboratorio.
- 15 Nota: se utilizó un kit (QIAamp DNA Mini, Quiagen, nº 51304) de extracción de ADN según las instrucciones del fabricante, con modificaciones según se describe a continuación. Se llevaron a cabo todas las etapas a temperatura ambiente.
- 5) Añadir 180 µL de tampón de lisis tisular (tampón ATL) a cada muestra.
- 20 6) Disociar completamente las muestras mediante el uso de microtijeras.
- 7) Añadir 40 µL de proteinasa K y mezclarlos mediante centrifugación con impulsos durante 15 segundos.
- 8) Incubar a 56°C durante la noche para lisar por completo la muestra.
- 25 9) Añadir 4 µL de RNasa A (100 mg/ml), mezclarlos mediante centrifugación con impulsos durante 15 segundos e incubar durante 2 minutos a temperatura ambiente.
- 10) Añadir 200 µL tampón de lisis (tampón AL) y mezclarlos mediante centrifugación con impulsos durante 15 s.
- 30 11) Incubar a 70°C durante 10 minutos.
- 12) Añadir 200 µL de etanol (100%) y mezclarlos mediante centrifugación con impulsos durante 15 segundos.
- 35 13) Transferir con cuidado todo el lisado a la columna QIAamp MinElute.
- 14) Centrifugar a 6000g durante 1 min.
- 40 15) Colocar la columna QIAamp MinElute en un tubo limpio de toma de muestras de 2 mL y desechar el tubo de toma de muestras que contiene el flujo pasante.
- 16) Añadir 500 µL de tampón de lavado (tampón AW1) y centrifugar a 6000g durante 1 minuto.
- 45 17) Colocar la columna QIAamp MinElute en un tubo limpio de toma de muestras de 2 mL y desechar el tubo de toma de muestras que contiene el flujo pasante.
- 18) Añadir 500 µL de tampón de lavado (tampón AW2) y centrifugar a 20000g durante 3 minutos.
- 50 19) Colocar la columna QIAamp MinElute en un tubo limpio de toma de muestras de 2 mL y desechar el tubo de toma de muestras que contiene el flujo pasante.
- 20) Centrifugar a 20.000 × g durante 1 minuto para secar la membrana.
- 55 21) Colocar la columna QIAamp MinElute en un tubo limpio de microcentrifugadora y desechar el tubo de toma de muestras que contiene el flujo pasante.
- 22) Aplicar 200 µL de tampón de elución (tampón AE) e incubarlos a temperatura ambiente (15-25°C) durante 1 minuto.
- 60 23) Centrifugar a 6000 × g durante 1 minuto.
- 24) Colocar la columna QIAamp MinElute en otro tubo limpio de microcentrifugadora y repetir las etapas 22-23.

25) Cuantificar la concentración de ADN bicatenario en las muestras utilizando un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). Inicializar el instrumento utilizando agua y dejarlo virgen utilizando tampón de elución (tampón AE).

Resultados:

- 5 Se calcula la cantidad de ADN presente por peso de una muestra a partir de la cantidad media de las 2 muestras de ADN recogidas en las etapas 23 y 24 del protocolo. Se promedian entonces, para una única etapa, los resultados obtenidos en cinco muestras para proporcionar los resultados presentados en la siguiente tabla:

Tabla 3

Donantes	Etapas	ng de ADN/mg de muestra (n=5)	Desviación típica
UPR 9611	Previa al BRIJ	304,3	89,7
	BRIJ 0,2% posterior al PAA	63,0	44,6
	BRIJ 0,4% posterior al PAA	92,7	46,4
UPS9238	Previa al BRIJ	444,5	90,8
	BRIJ 0,2% posterior al PAA	114,7	34,9
	BRIJ 0,4% posterior al BRIJ	239,8	16,5
UPR9656	Previa al BRIJ	242,4	29,5
	BRIJ 0,5% posterior al PAA	125,1	28,8

10 Conclusión:

De media, los experimentos llevados a cabo en 3 donantes (5 muestras por donante en cada etapa), revelaron que se eliminó un 63±15% de ADN entre las etapas previa al BRIJ y las etapas posteriores al PAA.

Ejemplo 8: Inhibición de la proliferación celular y de la actividad celular de tejido de fascia no procesado y un ejemplo de elementos presentes en tejido no procesado que pueden inhibir la fijación y la proliferación celulares a tejidos en condiciones *in vivo* y/o *in vitro*.

15 Se prepararon muestras congeladas de tejido de fascia mediante la unidad de procesamiento para su uso en este estudio. Las muestras de tejido de fascia solo fueron desbridadas de elementos sanguíneos extrínsecos y no fueron procesadas según la presente invención. Para valorar las propiedades de inhibición celular de extractos de estos tejidos, se extrajeron compuestos presentes en los productos finales durante 24 horas siguiendo las normas generales ISO 10993-5 e ISO 10993-12. Entonces, se aplicaron medios de extracción, que contenían los compuestos inhibidores potenciales, a las células de fibroblastos en cultivo (línea celular L-929 ATCC n° CCL-1). Se llevó a cabo una valoración cuantitativa de la densidad de células sanas utilizando un ensayo de proliferación celular CyQUANT® Direct mientras que se llevaron a cabo valoraciones cualitativas de la morfología celular mediante observación microscópica.

25 Se escogió el ensayo de proliferación celular CyQUANT® Direct por su capacidad para proporcionar una medida de densidad de células viables en un experimento de una única etapa. De hecho, combina una tinción de unión a ADN y un reactivo de supresión de fondo. La tinción de unión a ADN es un reactivo permeable a las células vivas que se concentra principalmente en el núcleo de células de mamíferos metabólicamente viables, mientras que la tinción de supresión es impermeable a las células vivas (viables) y apaga la fluorescencia de la tinción de unión a ADN en células con una membrana celular comprometida. La combinación de estos dos componentes tiene como resultado un ensayo basado tanto en el contenido del ADN como en la integridad de la membrana celular.

35 Se emitió la hipótesis de que la evaluación de citotoxicidad de extractos de materiales implica una extracción de agentes potencialmente tóxicos de materiales y una aplicación subsiguiente de estos extractos a una población de células metabólicamente viables de mamíferos. El ensayo de proliferación celular CyQUANT® Direct utiliza una tinción que se une a ácidos nucleicos y se unirá con el ADN de células tanto vivas como metabólicamente no vivas. Sin embargo, el ensayo también emplea un reactivo de supresión de fondo que suprimirá la fluorescencia de la tinción. Dado que el reactivo de supresión de fondo no penetrará en el interior de una célula viable, cualquier célula viable en la población de células tendrá fluorescencia, pero las células no vivas no la tendrán debido a la acción de apagado del reactivo de supresión de fondo. Por lo tanto, este ensayo es una herramienta útil para determinar los porcentajes de células viables con respecto a las no viables en una población de células y cualquier extracto de material que contenga agentes extraíbles tóxicos a una célula de mamífero alterará este porcentaje de células viables con respecto a las no viables y, por lo tanto, puede ser utilizado para determinar de forma cuantitativa la toxicidad de los extractos.

Materiales y procedimientos:

45 Todos los procedimientos fueron llevados a cabo en un entorno aséptico de trabajo. Se adaptaron los siguientes materiales y condiciones a partir de las recomendaciones descritas en ISO 10993-12.

ES 2 695 579 T3

Etapas experimentales:

- 1) Se diseccionaron muestras cuadradas de 1 cm² de fascia humana y fueron colocadas en los pocillos de una placa de 6 pocillos de baja adherencia (total de 21 cm²/pocillos), 1 pocillo/donante (Costar, nº 3471).
- 5 2) Se registró el peso total de las muestras y se añadieron 7 mL de caldo de extracción a cada pocillo (caldo de expansión celular L-929):
 - α -MEM (Gibco, nº 12571)
- 10
 - 10% de suero fetal bovino
 - 1% de penicilina/estreptomicina
- Nota: La presencia de suero bovino fetal debería permitir la extracción de materiales lixiviables polares y no polares. Según ISO 10993-12, el volumen de extracción debería ser de 1 mL para 3 cm² de muestras (grosor > 0,5 mm).
- 15 2) Entonces, se colocaron las muestras en un oscilador y fueron incubadas durante 24 horas a 37°C en una incubadora (atmósfera con >90% de humedad y 5% de CO₂). También se incubó caldo por sí solo para controles de L-929 y controles positivos (SDS).
- 20 3) Fueron colocadas en placas 20.000 células L-929 subconfluentes/pocillos en una placa negra de fondo transparente de 96 pocillos (cultivo tisular tratado, Costar nº 3904) en un volumen final de 100 μ L de medio de expansión. Se sembró otra placa negra con una densidad de 10.000 células/pocillo para garantizar el uso de células subconfluentes en el momento del ensayo (es decir, el día 3).
- 25 4) El caldo de extracción fue recogido en tubos Falcon de 15 mL y centrifugado a 300g durante 10 minutos para eliminar partículas/células grandes extraídas de la fascia (siendo fascia un injerto congelado; de hecho, se observaron las células en el medio de extracción si no se llevaba a cabo esta etapa, lo que tenía como resultado un sesgo en el siguiente ensayo Cyquant®).
- 30 5) Se aplicó el sobrenadante del medio de extracción a las células L-929 colocadas en placas el día 1 (eliminación del caldo de expansión y adición de 100 μ L de medio de extracción/pocillo). Al mismo tiempo, se llevaron a cabo controles negativo, positivo y en virgen:
 - control negativo: células en el medio incubado de expansión (5 pocillos).
 - control positivo: células, 0,1 y 0,2 mg/ml de SDS (dodecilsulfato de sodio) en medio incubado de expansión (5 pocillos/cada concentración de SDS).
 - variable experimental: células y medio de extracción (5 pocillos/donante).
 - en virgen: únicamente medio incubado de expansión, sin células, ni tejido (2 pocillos por cada condición individual).
- 40 6) Se incubaron las placas durante otras 24 horas a 37°C en una incubadora. (Nota: para crear una curva de calibración, las células L-929 fueron colocadas en placas partiendo de concentraciones que variaban desde 0 hasta 60.000 células por pocillo de una placa negra de fondo transparente de 96 pocillos).
- 45 7) Se llevaron a cabo evaluaciones cualitativas de la morfología celular mediante observaciones microscópicas antes de efectuar la cuantificación de células sanas utilizando el ensayo de proliferación celular CyQUANT® Direct (Invitrogen, nº 35012).
- Nota: todas las siguientes etapas fueron llevadas a cabo evitando una exposición directa a la luz.
- 50 8) Se preparó reactivo Cyquant® según la siguiente receta (para 12 ml de reactivo):
 - 11,7 mL de PBS
 - 48 μ L de tinción de ácidos nucleicos CyQUANT® Direct
 - 240 μ L de supresor de fondo CyQUANT® Direct
- 55 9) Se mezcló bien la anterior solución antes de añadir 100 μ L de la misma a cada pocillo de la placa que contenía las células L-929.

10) Entonces, se incubó la placa durante 1 hora a 37°C en una incubadora.

11) Se eliminaron las burbujas de aire (si las había) utilizando una aguja de calibre 26 para evitar interferencias.

5 12) Se leyó la fluorescencia a la longitud de onda de excitación/emisión de 485/535 nm en un modo de mínimo (SpectraMax Gemini EM, Molecular Devices).

Resultados:

10 Como puede observarse en la Figura 5, la señal fluorescente era proporcional a la densidad celular, con una buena respuesta lineal. Los resultados obtenidos con los controles positivos y los grupos experimentales sometidos a ensayo son resumidos en la Figura 6.

Como puede verse en la Figura 6, la exposición de las células L-929 al medio de extracción durante 24 horas tuvo poco efecto sobre la densidad de células sanas. Es importante hacer notar que la densidad celular utilizada afectó muchísimo los resultados obtenidos. De hecho, las células parecían ser más sensibles a compuestos inhibidores cuando fueron colocadas en placas a 20kc.

15 Es importante hacer notar que los resultados de cuantificación obtenidos con el ensayo Cyquant® apenas se correlacionaban con las observaciones microscópicas en la Figura 7: las células de control (A, y mayor aumento B) eran densas y estaban muy dispersas sobre la superficie de los pocillos de plástico. Las células expuestas al medio de extracción (C, y mayor aumento D) eran menos densas y una fracción elevada de las mismas era redondeado, a pesar de que el ensayo Cyquant® parece indicar que estas células seguían teniendo una membrana sana en comparación con las células expuestas a SDS (0,1 mg/mL de SDS (E) o 0,2 mg/mL (F)).

Conclusión:

25 Según los criterios descritos en ISO 10993-5, se considera que los ensayos de cuantificación que tienen como resultado más de un 30% de reducción en la viabilidad celular un efecto citotóxico o de inhibición celular. Los resultados promediados obtenidos en los 5 donantes de este experimento estuvieron precisamente en el límite de este umbral del 30% (ligeramente menor para una de las fascias procesadas del donante UBO9084).

Los documentos ISO también proporcionan direcciones en cuanto a una evaluación morfológica cualitativa de la toxicidad/inhibición celular (véase la Tabla 4).

Tabla 4 - Clasificación morfológica cualitativa de citotoxicidad de extractos

Puntuación	Reactividad	Condiciones de todos los cultivos
0	Ninguna	Gránulos intracitoplasmáticos diferenciados, sin lisis celular ni reducción del crecimiento celular
1	Ligera	No más de un 20% de las células son redondas, unidas de forma laxa y sin gránulos intracitoplasmáticos, o muestran cambios en la morfología; hay presentes células lisadas esporádicas; solo es observable una ligera inhibición del crecimiento.
2	Leve	No más de un 50% de las células son redondas, libres de gránulos intracitoplasmáticos, sin mucha lisis celular; no se observa más de un 50% de inhibición del crecimiento.
3	Moderada	No más de un 70% de las capas celulares contienen células redondeadas o están lisadas; las capas celulares no están completamente destruidas, pero no se observa más de un 50% de inhibición del crecimiento.
4	Fuerte	Destrucción completa o casi completa de las capas celulares.

30 Según esta tabla, a pesar de una inhibición del crecimiento de aproximadamente un 30%, más de un 50% de las células eran redondeadas después de una exposición al medio de extracción, por lo que se puede concluir de forma razonable que los elementos presentes en el tejido normal pueden ser inhibidores de una infiltración celular en tales tejidos y que la eliminación de estos elementos inhibidores debería facilitar una naturaleza regenerativa de los tejidos procesados.

35 Ejemplo 9: Biocompatibilidad de una matriz de tejido dérmico micronizado

El fin de este experimento es someter a ensayo y documentar la biocompatibilidad de dermis micronizada producida mediante el procedimiento de la presente invención. Se prepararon muestras de dermis micronizada liofilizadas según el procedimiento descrito en la presente memoria para obtener dermis micronizada. La biocompatibilidad fue evaluada mediante contacto directo de las muestras con células L-929 (ATCC n°CCL-1, fuente: *Mus musculus*) durante dos meses. Se llevó a cabo una evaluación cualitativa de la morfología celular mediante observación

microscópica. Se llevó a cabo una evaluación cuantitativa de la densidad de células sanas utilizando el ensayo de proliferación celular CyQUANT®.

Procedimiento:

5 *Nota: todos los procedimientos fueron llevados a cabo en una cabina de flujo laminar en condiciones asépticas. Los siguientes materiales y condiciones han sido adaptados a partir de las recomendaciones descritas en ISO 10993-12 e ISO 10993-xx.*

Día 1

10 Se prepararon muestras (lote 2) de dermis micronizada acelular liofilizadas según el procedimiento de la presente invención. Dermis micronizada del donante BO39698, UBO 0099050202-12; tamaño de partícula sometida a ensayo 25-300 µm.

Se pesó la dermis micronizada y luego fue mezclada con caldo preparado, α-MEM Gibco (lote nº 1045867), con un 10% de suero fetal bovino, PAA (lote nº 20411-7008) y un 1% de penicilina-estreptomicina (Sigma, 051M0853), centrifugada y colocada en una placa de adherencia ultra baja de 6 pocillos (Corning, Costar nº 3471, lote nº 08711003, fecha de caducidad 27/03/2014), según la Tabla 5.

15 Tabla 5

Muestra	Peso (g)	Caldo (ml)
UMTB dermis micronizada (3)	0,003/cada una	1/cada una
Controles, UMTB dermis micronizada (2)	0,003/cada una	1/cada una

El cultivo P5 de L-929 subconfluentes fue dividido y contado según protocolos estándar.

20 Tres de las muestras de dermis micronizada fueron sembradas con 800.000 células L-929, dos muestras fueron utilizadas como control sin células. Se incubaron las muestras durante 2 meses a 37°C, 5% de CO₂, ≥90% de humedad (equipo nº 08-016). También se colocó caldo por sí solo en la misma placa y fue incubado en las mismas condiciones.

Días 2-55

Se cambió la mitad del caldo dos veces por semana. Se tomaron fotografías los días 10, 16 y 30.

Día 57

25 Se recogieron y dividieron cultivos de L-929 (P6) según el protocolo estándar y se colocaron 300.000 células en 2 ml de caldo recién preparado en un tubo de centrifugadora. Estas células fueron utilizadas posteriormente para una curva de calibración. Se centrifugaron las células, junto con una muestra de dermis micronizada sembrada y un control. El sobrenadante fue desechado y los sedimentos fueron congelados a -80°C.

Día 60

30 Se recogieron y centrifugaron dos muestras de dermis micronizada y un control, se desechó el sobrenadante y los sedimentos fueron congelados a -80°C.

Día 61

Se llevó a cabo una evaluación cuantitativa de densidad de células sanas utilizando el *kit* de ensayo de proliferación celular CyQUANT® (lote nº 1050079), C7026.

35 1) Se preparó reactivo CyQUANT® mezclando 7,6 ml de H₂O, 400 µl de tampón y 100 µl de Cyquant. El tampón de lisis obtenido fue administrado de la siguiente forma:

- se añadieron 200 µl a los pocillos A1-H1 en una placa negra de 96 pocillos (Corning Costar 3650, lote nº 24211045, fecha de caducidad 30/8/2013) para la curva de calibración.
- se añadieron 200 µl a los sedimentos celulares en un tubo de centrifugadora (300.000 a -80°C) para la curva de calibración
- se añadieron 800 µl a una muestra de dermis micronizada (control) en una placa negra de 96 pocillos (3 pocillos)
- se añadieron 800 µl a las muestras de dermis micronizada sembrada con células L-929 en una placa negra de 96 pocillos (6 pocillos, 3 cada una)

- 2) Las muestras fueron centrifugadas.
- 3) Pipetar con cuidado, homogeneizar y añadir 200 µl de la suspensión celular en el pocillo A1.
- 5 4) Pipetar 200 µl de la solución de A1 a B1 para crear una curva de calibración.
- 5) Pipetar con cuidado y homogeneizar sin crear burbujas, continuar el procedimiento hasta el pocillo G1 (H1=virgen).
- 10 6) Pipetar 200 µl de la solución en G1 y desecharlos.
- 7) Centrifugar ligeramente y colocar en placa las muestras y el control.
- 8) Proteger de la luz, cubrir la placa con papel de aluminio.
- 15 9) Incubar durante 5-15 minutos a temperatura ambiente.
- 10) Se leyó la fluorescencia a la longitud de onda de excitación/emisión de 480/520 nm en un modo de máximo utilizando una Molecular Devices Flex Station 3.
- 20 Análisis e interpretación de los datos:

Las muestras recogidas el día 60 muestran un mayor número de células que las recogidas el día 57, según se preveía. Las células L-929 proliferaron y sobrevivieron durante 60 días unidas a la matriz de dermis micronizada, lo que muestra que esta matriz es biocompatible. Véanse la siguiente Tabla 6 y las Figuras 8 y 9 para estos datos cuantitativos.

25 Tabla 6

Muestras	Número de células	Desviación típica	Criterios de aceptación	
			Válido	Inválido
Dermis micronizada + L-929 (día 60)	558.875	7.198		
Dermis micronizada + L-929 (día 57)	429.054	23.107		
Control positivo L-929 (sembrado el día 1)	800.000	ND		
Controles negativos	Número de células	Desviación típica	Criterios de aceptación	
			Válido 0	Inválido 0
Dermis micronizada	0	ND	Sí	

Análisis cualitativo:

Se examinaron las muestras microscópicamente y se tomaron microfotografías digitales de cada condición con el objetivo de ilustrar la proliferación celular y la adherencia de las células a la matriz dérmica. Todas las microfotografías fueron tomadas a 100x a no ser que se haga notar lo contrario. Se tomaron microfotografías similares de muestras de dermis micronizada en las que no había células L-929 sembradas para que sirviesen de control.

El día 10, mostrado en la Figura 10, las células L-929 parecían sanas y agregadas en la superficie de la dermis micronizada (A-C). También se muestra (B) un detalle a 200x. El control negativo (D) muestra únicamente dermis micronizada de 25-300 µm. Esto continúa el día 16, mostrado en la Figura 11. El día 30, mostrado en la Figura 12, las células siguen estando sanas y agregadas a la superficie de la dermis micronizada (A-C).

Conclusiones:

La dermis micronizada producida mediante el procedimiento de la presente invención tiene una estructura de matriz que es biocompatible y proporciona un entorno que es adecuado y apropiado para la fijación y la proliferación celulares.

40 Ejemplo 10: Resorción de matriz de tejido dérmico micronizado tras la inyección en ratones calvos.

El fin de este estudio fue examinar la resorción durante cuatro semanas del producto de matriz dérmica micronizada inyectado subcutáneamente en cualquier lado de la columna vertebral de un ratón calvo.

Se emitió la hipótesis de que el producto de matriz dérmica no debería ser resorbido rápidamente en un ratón calvo, utilizando un producto competitivo como control positivo. El tamaño del sitio de inyección no debería cambiar de forma significativa. Sin embargo, esta medida es bastante subjetiva. También se examinará la evidencia histológica de la resorción.

5 Materiales y procedimientos:

Cada ratón fue inyectado subcutáneamente con un artículo de ensayo y de control. Se examinaron los sitios de inyección mediante palpación y medición al acabar. Se obtuvieron los pesos corporales en el momento de la inyección, diariamente durante la primera semana, luego dos veces durante cada semana a partir de entonces, siendo recogidos los pesos al acabar. Se observaron los animales a diario en la jaula buscando signos de salud clínica general.

Al final de la duración programada, se sacrificaron los animales designados. Los sitios de inyección fueron palpados y medidos y el tejido circundante fue escindido quirúrgicamente. Se colocaron los tejidos en formol para su fijación. Entonces, las muestras fueron tincionadas con H&E, azul alcian, tricromo y para buscar elastina.

Se sugiere el ratón como un animal modelo apropiado para evaluar la biocompatibilidad mediante las normas generales actuales ISO de ensayo. El tamaño del grupo está basado en la cantidad mínima de animales requerida para una evaluación biológica. Se escogió el número de animales para proporcionar cierto sentido estadístico en los resultados.

Se seleccionó la vía de exposición de inyección subcutánea debido a que es la vía prevista de administración en seres humanos.

20 *Nota: todos los procedimientos fueron llevados a cabo en un entorno aséptico de trabajo. Los siguientes materiales y condiciones fueron adaptados a partir de las recomendaciones descritas en ISO 10993-12.*

Resultados:

Palpaciones y mediciones

Tabla 6: área media por instante de medición

Grupo	Días posteriores al implante							
	0	2	4	6	13	20	27	28
Control	140,1	154,9	170	166,3	168	201,7	174,5	171,2
Ensayo	146,2	174	189,3	183,4	188,6	213,5	147,9	190,7

25

Observaciones histológicas

Tabla 7

Animal	Lado	Inflamación crónica	Materia extraña	Células gigantes	Desorganización de la elastina	Inflamación aguda	Respuesta general
		0-4	0-4	0-4	0-4	0-4	0-4
1	Control	1	2	0	0	0	1
1	Ensayo	1	1	0	0	0	1
2	Control	2	1	0	0	0	2
2	Ensayo	1	1	0	0	0	2
3	Control	1	1	0	0	0	1
3	Ensayo	1	0	0	0	0	1

Observaciones generales:

30 El implante del artículo de control fue mixoideo con celularidad poco densa. En el implante del artículo de ensayo, el colágeno es más denso y menos celular.

Conclusiones:

35 Tanto el artículo de control como el artículo de ensayo muestran la evolución de una pseudocápsula subdérmica con una inflamación leve. Ninguno muestra una respuesta inflamatoria significativa ni células gigantes. El artículo de control consiste en tejido suelto, vagamente mixoideo, fibroconectivo. La angiogénesis está más desarrollada en el artículo de control que en el artículo de ensayo. El artículo de ensayo consiste en colágeno desorganizado más maduro con fibroblastos quiescentes. En consecuencia, el artículo de ensayo es más "activo".

Ejemplo 11: Datos clínicos de cicatrización de heridas utilizando una matriz de tejido dérmico como injerto

Se suministraron matrices de tejido dérmico en forma de injertos de tejido a diversos clínicos para comprobar si los injertos podrían fomentar una reparación regenerativa de tejido blando en aplicaciones *in situ* en seres humanos. Los clínicos siguieron sus propios procedimientos y protocolos para aplicar y/o utilizar los injertos de tejido de matriz dérmica en heridas de sus pacientes. Al menos dos proporcionaron datos de sus resultados, mostrados en las Figuras 13 y 14.

5

Específicamente, en la Figura 13 se colocó un injerto de 4x4 cm de matriz dérmica, tal como una capa dérmica, en un área de piel herida (panel A). El día 12 (panel B), la herida ya comenzaba a cicatrizar, como es evidente por el tejido de granulación que se desarrollaba en el sitio, al igual que por el tamaño reducido de la herida. El día 40 (panel C), la herida ya estaba cicatrizada casi por completo. Más que simplemente cicatrizar, se producía una regeneración, según se indica mediante la falta de cicatrización en el tejido.

10

La Figura 14, tomada de un paciente distinto, también muestra una reparación regenerativa. El día 1 (panel A), se colocó un injerto de matriz dérmica en una herida posteriormente a la radiación. Al día siguiente (panel B), la infiltración celular ya era observable. El día 30 (panel C), la regeneración del tejido herido estaba muy avanzada.

15

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para preparar una matriz de tejido adecuada para una reparación regenerativa de tejido blando, que comprende:
 - 5 poner en contacto una porción aislada de tejido conectivo con un tensioactivo,
 - poner en contacto el tejido conectivo con un desinfectante, reduciendo al menos uno de proteoglicanos, lípidos, fosfolípidos, ácidos nucleicos y antígenos de complejo principal de histocompatibilidad (CPH) que inhiben la infiltración y la fijación celulares, y deshidratando la matriz resultante de tejido para su almacenamiento, y
 - 10 que comprende, además, reducir el contenido de proteoglicanos del tejido conectivo en un intervalo de 30% hasta un 50%, de forma que la matriz de tejido contenga un 50% hasta un 70% de proteoglicanos extraíbles.
2. El procedimiento según se indica en la reivindicación 1, que comprende, además, reducir el contenido de lípidos y de fosfolípidos del tejido conectivo en al menos un 70%, preferentemente en un intervalo de 70% hasta un 95%.
3. El procedimiento según se indica en la reivindicación 1, que comprende, además, reducir el contenido de ácidos nucleicos del tejido conectivo en al menos un 30%, preferentemente en un intervalo de 30% hasta un 90%.
4. El procedimiento según se indica en la reivindicación 1, que comprende, además, reducir el contenido de antígeno de complejo principal de histocompatibilidad (CPH) I y II del tejido conectivo en al menos un 85%, preferentemente en un intervalo de 85% hasta un 99%.
5. El procedimiento según se indica en la reivindicación 1, que comprende, además, eliminar endotoxinas del tejido conectivo.
6. El procedimiento según se indica en la reivindicación 1, que comprende, además, poner en contacto el tejido conectivo con una enzima condroitinasa, preferentemente condroitinasa ABC, para reducir al menos uno de proteoglicanos, lípidos, fosfolípidos, antígenos de complejo principal de histocompatibilidad (CPH) I y II y endotoxinas en el tejido conectivo.
7. El procedimiento según se indica en la reivindicación 1, que comprende, además, poner en contacto el tejido conectivo con una endonucleasa para reducir los ácidos nucleicos en el tejido conectivo y con una enzima lipasa para reducir al menos uno de lípidos, fosfolípidos y endotoxinas en el tejido conectivo.
8. El procedimiento según se indica en la reivindicación 1, en el que dicho tensioactivo comprende al menos un tensioactivo aniónico, un tensioactivo no iónico, un tensioactivo catiónico y combinaciones de los mismos, en el que, preferentemente, dicho tensioactivo es un detergente que comprende al menos uno de un detergente aniónico, un detergente no iónico, un detergente catiónico y combinaciones de los mismos.
9. El procedimiento según se indica en la reivindicación 1, en el que dicho desinfectante comprende al menos uno de ácido peracético, dióxido de cloro, peróxido de hidrógeno, yoduro de polivinilpirrolidina, formaldehído, glutaraldehído, fenoxietanol, metilparabeno, propilparabeno, hidroximetilglicinato de sodio, urea de diazolidinilo, DMDM hidantoína, butilcarbamato de yodopropinilo, propilenglicol y combinaciones de los mismos.
10. Una matriz de tejido que puede obtenerse mediante el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, para su uso en la reparación regenerativa de tejido blando, comprendiendo dicha matriz de tejido: una porción de soporte estructurada para proporcionar una forma a la matriz de tejido y una porción no estructural dispuesta en una relación intercalada en al menos una parte de dicha porción de soporte, estando estructuradas colectivamente dicha porción de soporte y dicha porción no estructural para fomentar la infiltración, la fijación y la proliferación celulares de al menos una célula anfitriona en la matriz de tejido tras la implantación o el trasplante de la matriz de tejido en un tejido anfitrión, comprendiendo dicha porción de soporte y dicha porción no estructural niveles reducidos de al menos uno de proteoglicanos, lípidos, fosfolípidos, ácidos nucleicos, antígenos de complejo principal de histocompatibilidad (CPH) y endotoxinas, estando reducidos los niveles de proteoglicanos en un intervalo de 30% hasta un 50%, de forma que la matriz de tejido retenga un 50% hasta un 70% de proteoglicanos extraíbles.
11. La matriz de tejido según se indica en la reivindicación 10, en la que al menos una de dicha porción estructural y de dicha porción no estructural ha sido acelularizada, al menos parcialmente.
12. Un *kit* para una reparación regenerativa de tejido blando, comprendiendo dicho *kit*: una matriz tisular de tejido conectivo aislado según cualquiera de las reivindicaciones 10-11, comprendiendo dicha matriz de tejido niveles reducidos de al menos uno de proteoglicanos, lípidos, fosfolípidos, ácidos nucleicos, antígenos de complejo principal de histocompatibilidad (CPH) y endotoxinas, estando estructurada dicha matriz de tejido para fomentar la infiltración, la fijación y la proliferación celulares de al menos una célula anfitriona en la matriz de tejido tras su implantación o trasplante de la matriz de tejido en un tejido anfitrión.

13. El *kit* según se indica en la reivindicación 12, que comprende, además, una cantidad de solución de transferencia para transferir dicha matriz de tejido a un tejido anfitrión.

5 14. El *kit* según se indica en la reivindicación 12, que comprende, además, al menos un reactivo de ensayo para su uso en la detección de una reparación regenerativa en un tejido, estando estructurado dicho reactivo de ensayo para su uso en la detección de al menos uno de infiltración celular, fijación celular, proliferación celular, diferenciación celular y materiales sintetizados en un tejido, y que son seleccionados, preferentemente, de al menos un compuesto fluorescente, una etiqueta molecular, un sustrato de etiqueta molecular, una enzima, un radioisótopo, átomos pesados, un gen indicador, un vector, un compuesto luminiscente y un anticuerpo.

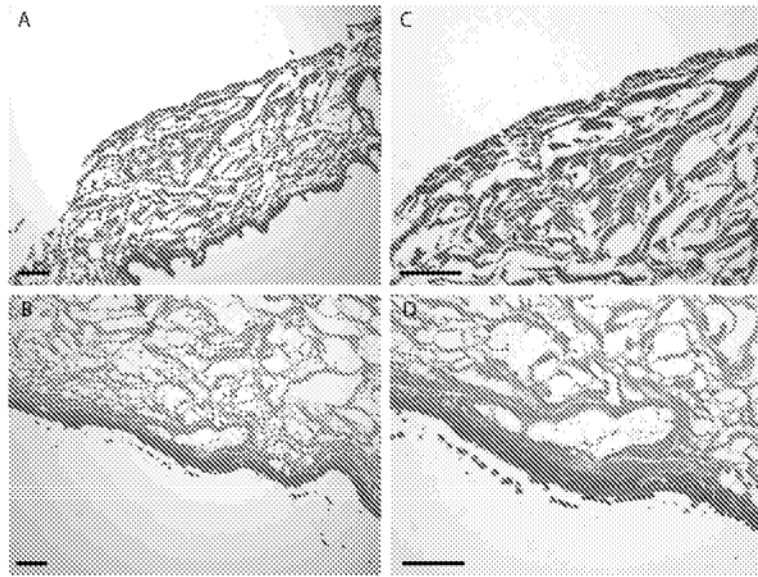


Figura 1

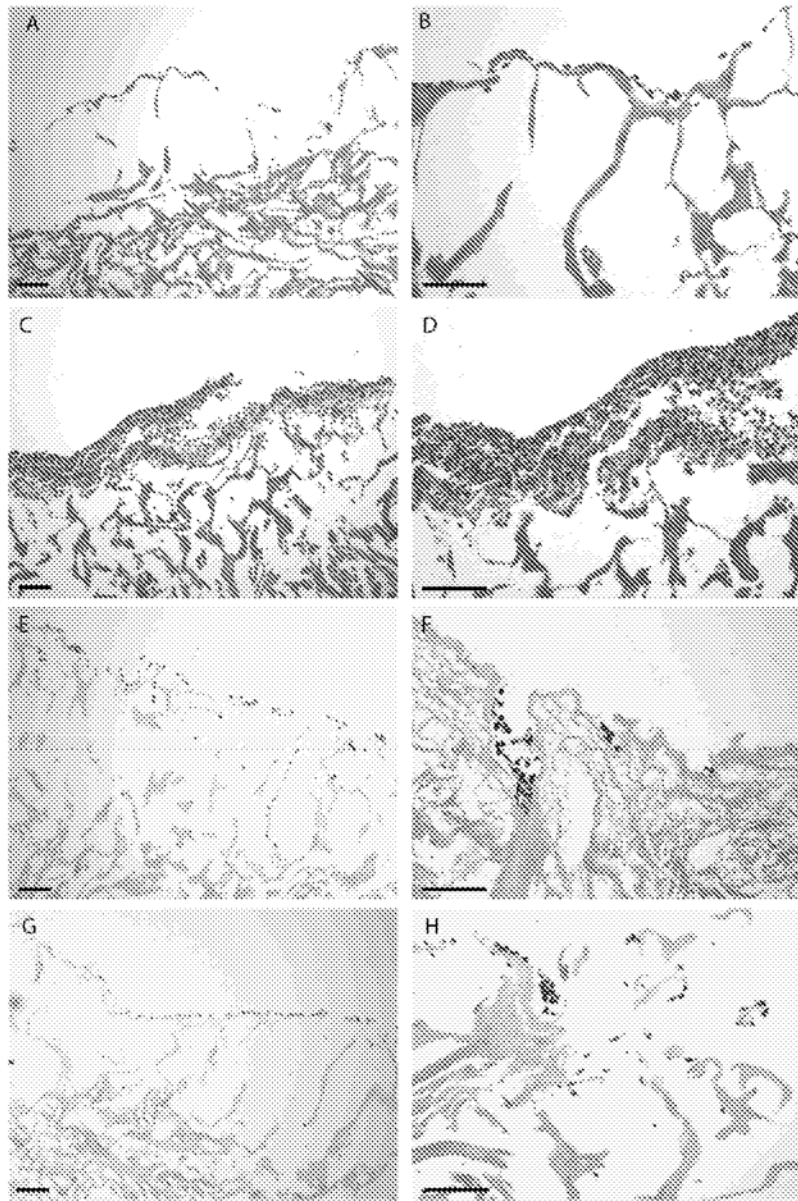


Figura 2

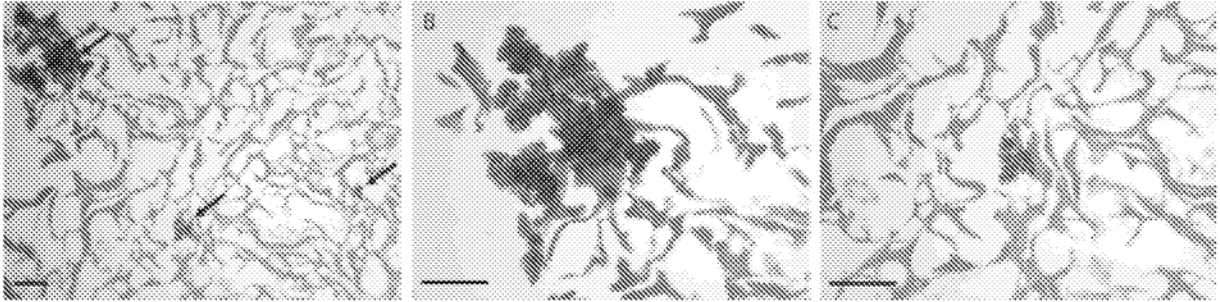


Figura 3

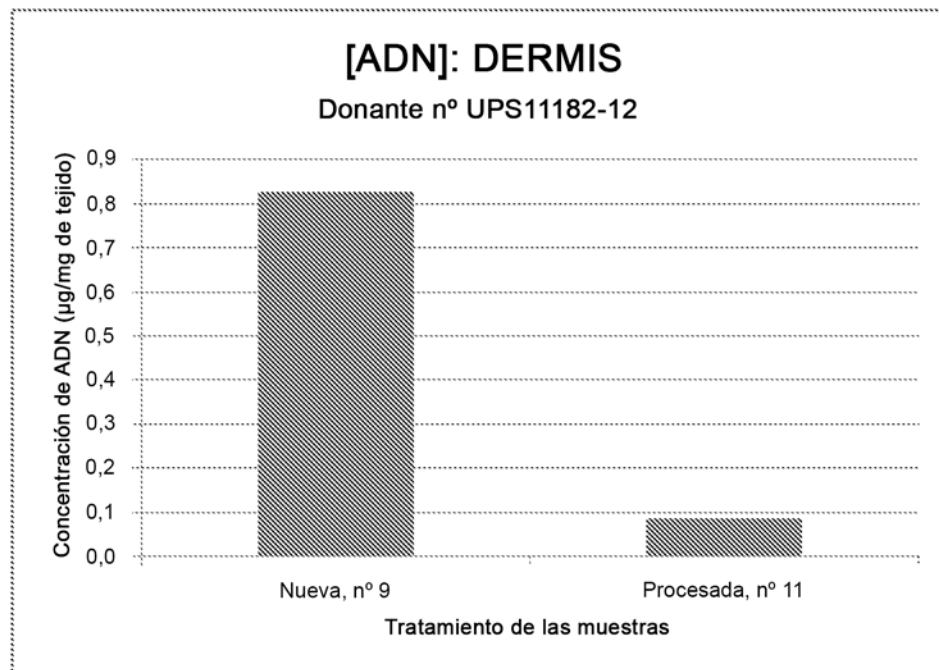


Figura 4

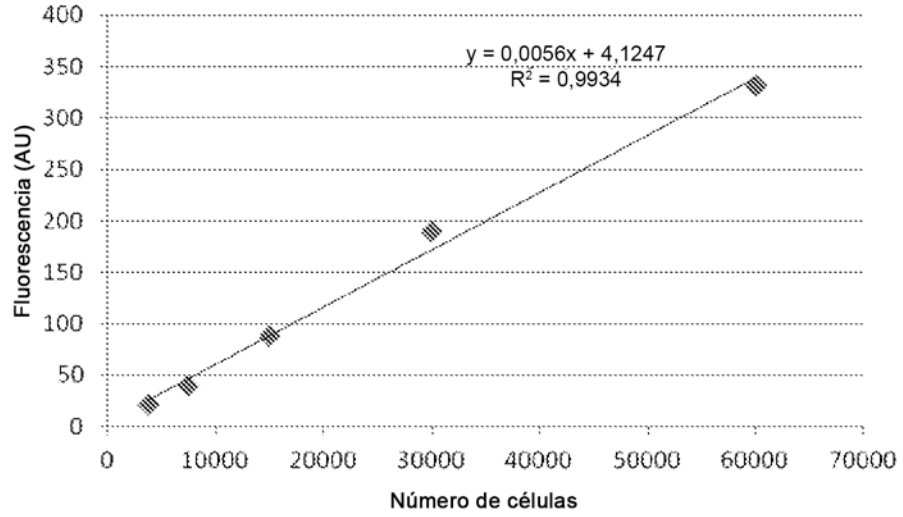


Figura 5

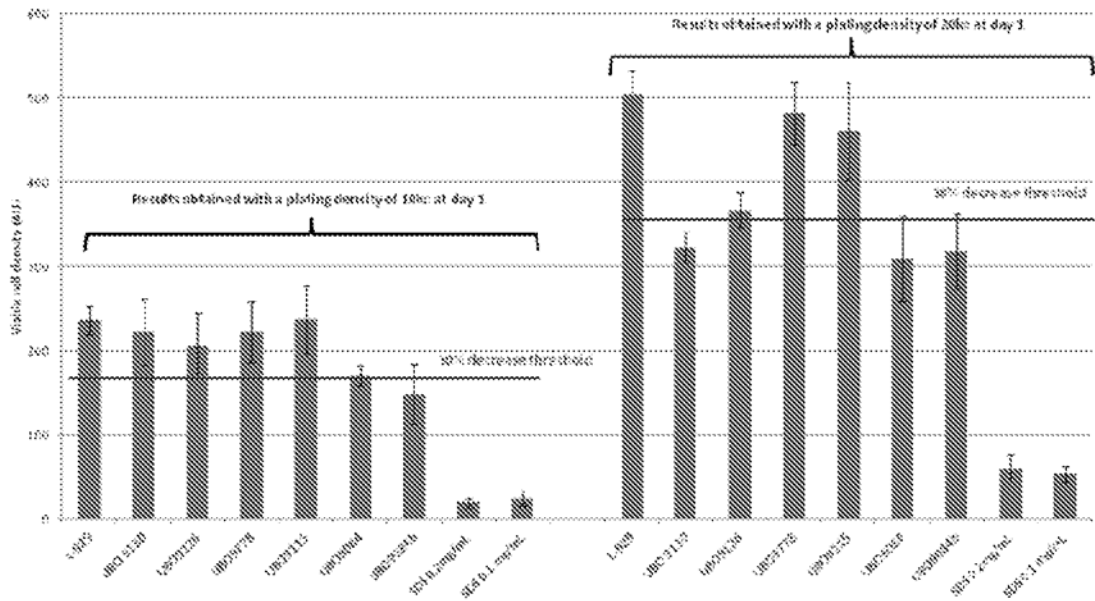


Figura 6

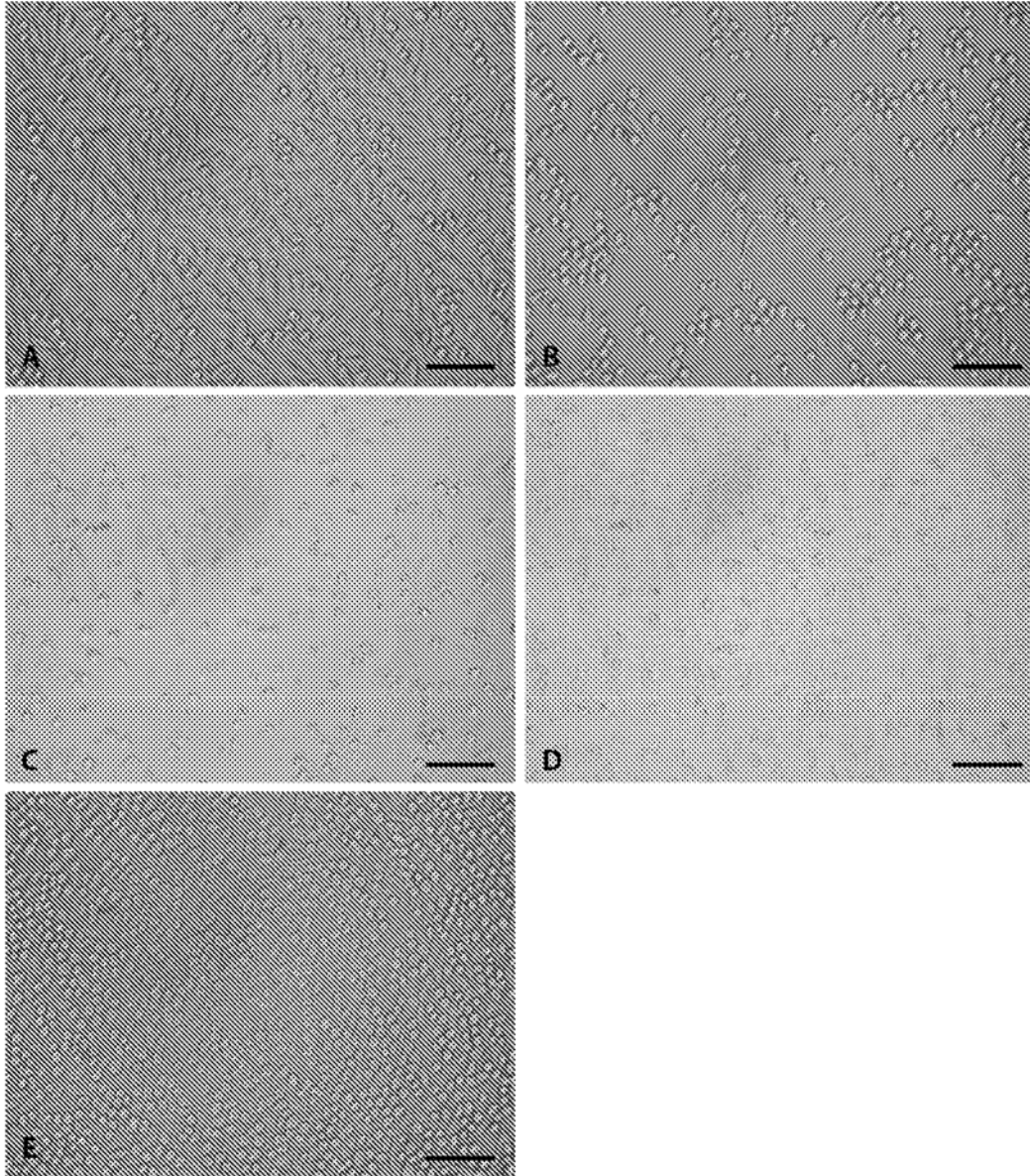


Figura 7

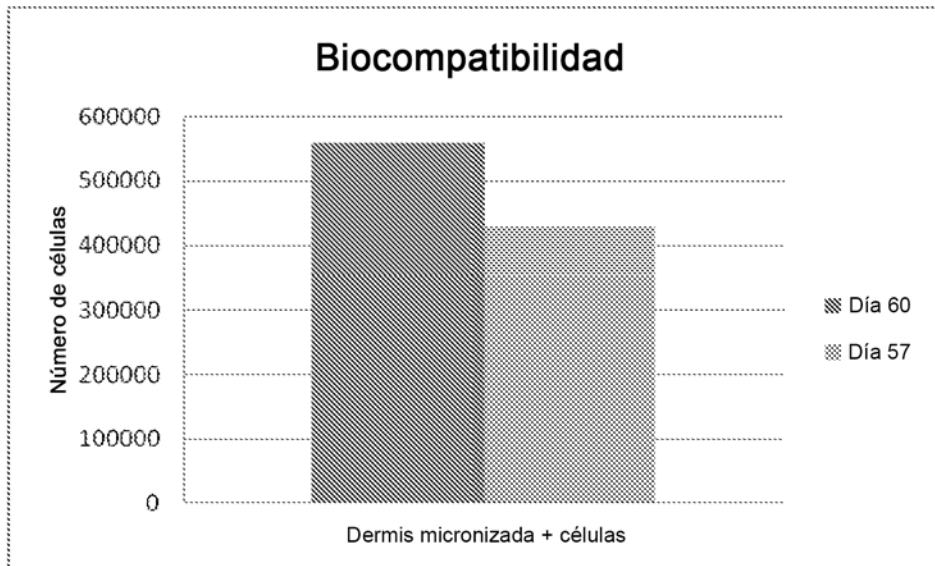


Figura 8

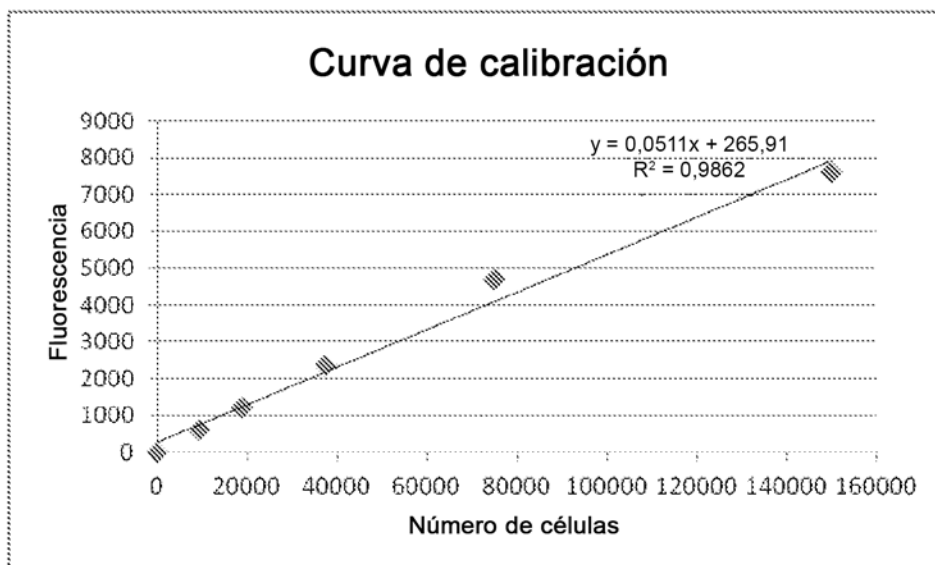


Figura 9

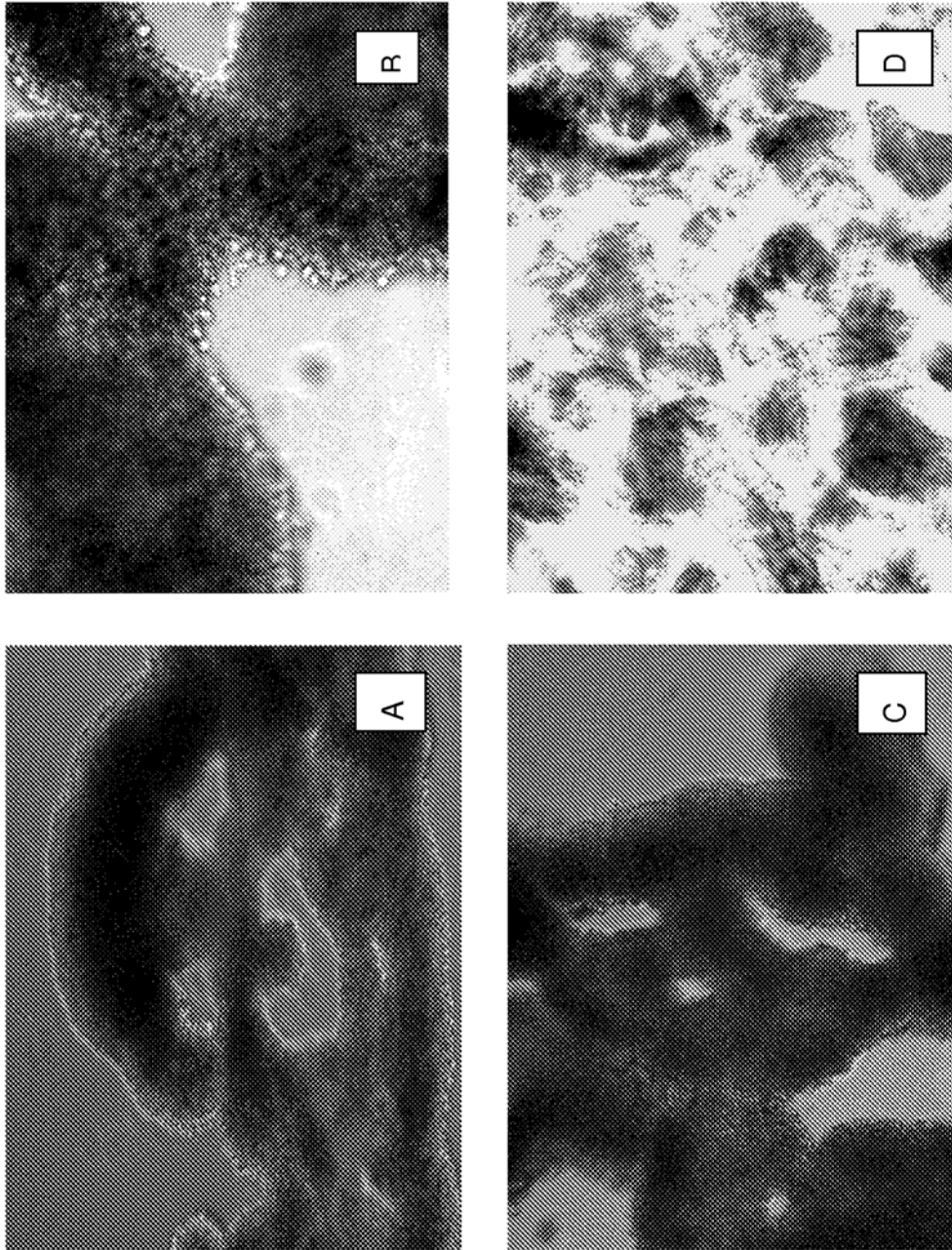


Figura 10

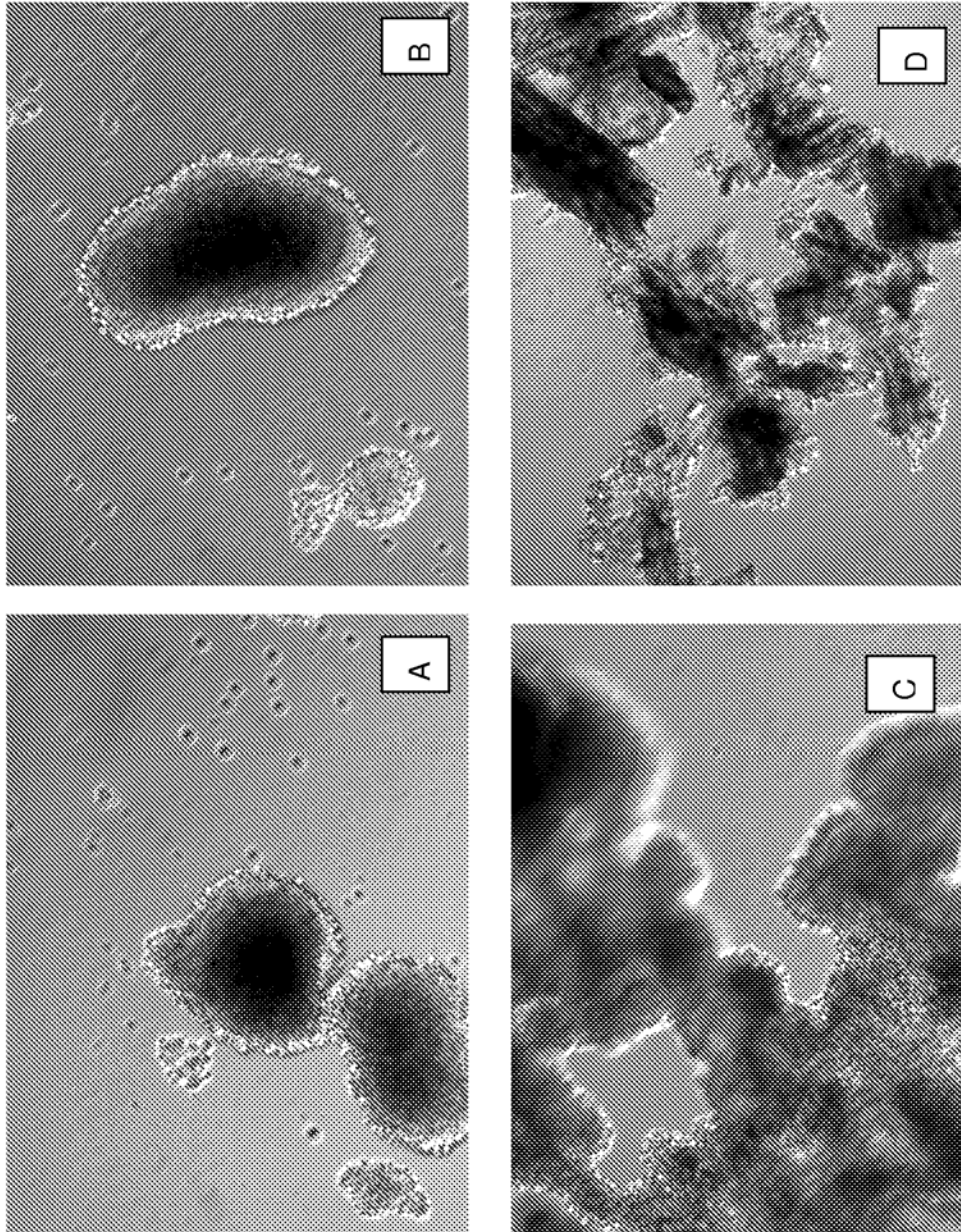


Figura 11

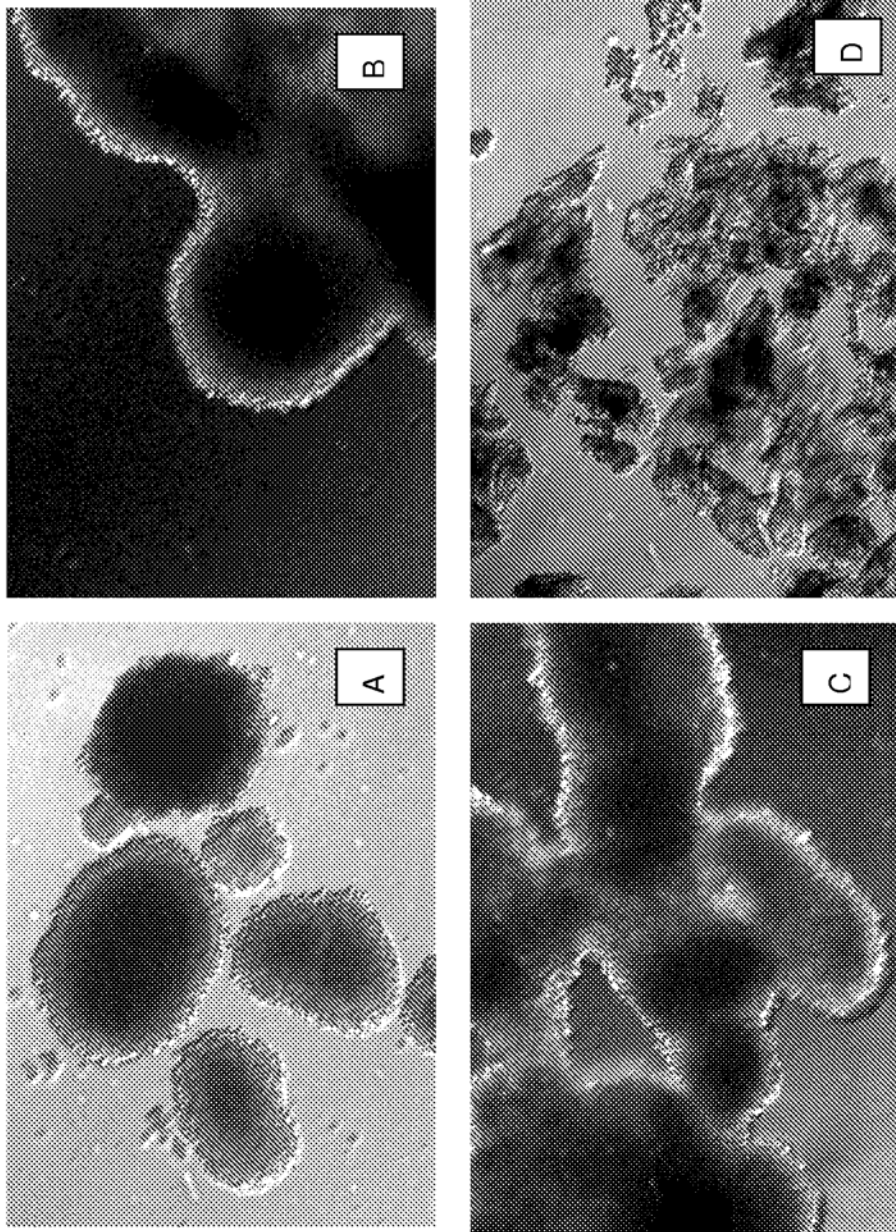


Figura 12

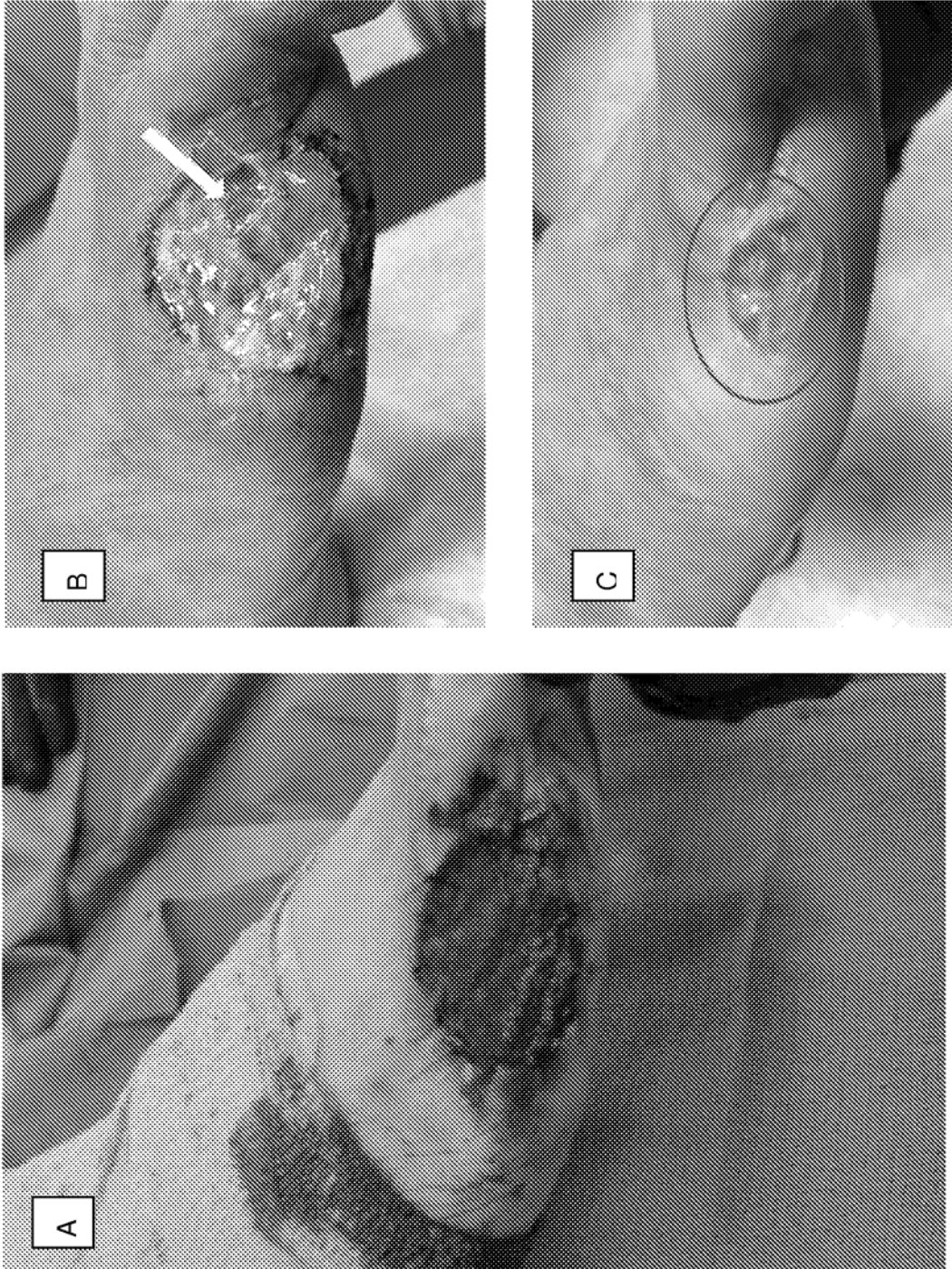


Figura 13



Figura 14