

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 993**

51 Int. Cl.:

A61L 27/36 (2006.01)

A61F 2/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.02.2013 PCT/US2013/027744**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2013 WO13134009**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2013 E 13708325 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 2822610**

54 Título: **Matrices de colágeno y tejido activadas por enzimas**

30 Prioridad:

08.03.2012 US 201261608458 P

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

18.06.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SUN, WENQUAN y
YU, XIAOHURA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 716 993 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

Matrices de colágeno y tejido activadas por enzimas

5 La presente descripción se refiere a matrices de tejido, y más particularmente, a métodos de preparar matrices de tejido activadas por enzimas y a matrices de tejido preparadas según esos métodos.

10 Las matriquinas son péptidos liberados mediante escisión proteolítica de matrices extracelulares de tejido. Estos péptidos bioactivos de colágeno, elastina, decorina, laminina, fibronectina y otras proteínas de la matriz pueden constituir señales químicas para las células circundantes. Se sabe que las matriquinas regulan las actividades celulares de una forma similar a las citoquinas y los factores de crecimiento. Las funciones de las matriquinas incluyen la regulación de la quimiotaxis, la mitogénesis, la angiogénesis y otros procesos.

15 Se sabe que las matrix metalloproteinases (metaloproteinases de la matriz - MMP) son enzimas que escinden las matrices de tejido extracelulares, lo que provoca la liberación de matriquinas. La presente invención describe un método de desactivar MMP e incorporarlas en matrices de tejido. Las MMP desactivadas se pueden reactivar automáticamente tras su implantación en pacientes animales o humanos, lo que provoca la liberación de matriquinas. Tales matrices de tejido activadas por enzimas pueden ser útiles para facilitar la cicatrización activa, la integración tisular y la regeneración tisular.

20 F.X. Maquart y col. describen las matriquinas en la regulación de la degradación de la matriz extracelular. El documento US 2005/0013870 describe una matriz extracelular descelularizada de tejidos corporales acondicionados y usos de la misma. El documento WO2009/149224 describe el tratamiento con elastasa de matrices de tejido acelulares. Wei H-J y col. describen la construcción de diversas estructuras porosas en pericardios bovinos acelulares como una matriz extracelular diseñada mediante ingeniería de tejido.

25 La invención está definida por las reivindicaciones.

30 Según ciertas realizaciones, se proporciona un método para preparar una composición de matriz de tejido. El método comprende seleccionar una matriz de tejido a base de colágeno y poner en contacto la matriz con una composición que contiene una enzima, en donde la composición que contiene una enzima contiene además un agente desactivador para reducir la actividad de la enzima.

35 En ciertas realizaciones, se proporciona una composición de matriz de tejido. La composición comprende una matriz de tejido a base de colágeno, en donde la matriz se ha puesto en contacto con una composición que contiene una enzima, y en donde la composición que contiene la enzima contiene además un agente desactivador para reducir la actividad de la enzima.

40 En ciertas realizaciones, se proporciona una matriz de tejido a base de colágeno para usar en un método. El método comprende seleccionar un sitio anatómico para el tratamiento, seleccionar una matriz de tejido a base de colágeno, en donde la matriz se ha puesto en contacto con una composición que contiene una enzima, y en donde la composición que contiene la enzima contiene además un agente desactivador para reducir la actividad de dicha enzima.

Descripción de los dibujos

45 La Fig. 1 es un diagrama de flujo que resume las diversas etapas que se pueden usar para producir matrices de tejido de la presente descripción, según ciertas realizaciones.

50 La Fig. 2 es un gráfico que muestra la concentración de aminas libres liberadas debido a la degeneración de la matriz de tejido, según ciertas realizaciones y descrita en el Ejemplo 2.

Las Fig. 3A y 3B son gráficos que muestran los cambios en la concentración de aminas libres debido a la degradación de la matriz de tejido a lo largo de dos períodos de tiempo independientes, según ciertas realizaciones de la invención y descritas en el Ejemplo 2.

55 Las Fig. 4A y 4B son gráficos que muestran la inhibición de la actividad de la MMP-1 por el EDTA en una concentración fija de MMP-1 y en diversas concentraciones de MMP-1, respectivamente, según ciertas realizaciones y descritas en el Ejemplo 3.

60 La Fig. 5 es un gráfico que muestra la restauración de la actividad suprimida de la MMP-1 mediante la adición de iones calcio, según ciertas realizaciones y descrita en el Ejemplo 4.

65 Las Fig. 6A y 6B son gráficos que muestran la concentración de aminas libres liberadas de human acellular dermis matrix (matriz dérmica acelular humana - hADM) después de la degradación inducida por MMP-1 y la restauración de la actividad de la MMP-1, respectivamente, según ciertas realizaciones y descritas en el Ejemplo 6.

Las Fig. 7A y 7B son gráficos que muestran la concentración de aminas libres liberadas de porcine acellular dermal matrix (matriz dérmica acelular porcina - pADM) después de la degradación inducida por MMP-1 y el efecto de la MMP-1 sobre las propiedades mecánicas de la pADM, respectivamente, según ciertas realizaciones y descritas en el Ejemplo 7.

La Fig. 8 es un gráfico que muestra la concentración de aminas libres liberadas en función del tiempo después del tratamiento con MMP-1, según ciertas realizaciones y descrita en el Ejemplo 8.

Las Fig. 9A y 9B son gráficos que muestran el efecto del tratamiento con MMP-1 sobre la estabilidad térmica de la pADM en función del tiempo y la concentración de MMP-1, respectivamente, según ciertas realizaciones y descritas en el Ejemplo 8.

Las Fig. 10A y 10B son gráficos que muestran los efectos de la implantación subcutánea sobre las matrices de tejido, según ciertas realizaciones y descritas en el Ejemplo 10.

Descripción de algunas realizaciones ilustrativas

A continuación, se hará referencia con detalle a ciertas realizaciones ilustrativas según la presente descripción, algunos ejemplos de las cuales se ilustran en los dibujos que se acompañan. Siempre que sea posible, los mismos números de referencia se utilizarán en todos los dibujos en referencia a las mismas partes o a partes similares.

En esta solicitud, el uso del singular incluye el plural, salvo que se indique lo contrario de forma específica. En esta solicitud, el uso de “o” significa “y/o”, salvo que se indique lo contrario. Además, el uso del término “que incluye”, así como otras formas, tales como “incluye” e “incluido”, no es limitativo. Debe entenderse que cualquier intervalo descrito aquí incluye los valores extremos y todos los valores entre los valores extremos.

Como se usa en la presente memoria, “matriz de tejido” se referirá a material procedente de tejido animal que incluye una matriz que contiene colágeno. Dichas matrices de tejido pueden incluir tejidos intactos, tejidos que han sido parcial o completamente descelularizados, o matrices colaginosas sintéticas (p. ej., matrices tridimensionales formadas a partir de tejidos suspendidos o procesados de cualquier otra manera). Como se describe además más adelante, las matrices de tejido adecuadas pueden ser acelulares. Se puede usar cualquier matriz de tejido adecuada, dependiendo del sitio de implantación previsto, siempre y cuando el tejido sea susceptible de usar con los métodos descritos en la presente memoria.

La matriz de tejido activada por enzimas descrita en la presente memoria posee varias propiedades que la hacen adecuada para usar en el tratamiento de tejidos. La matriz de tejido es regenerativa, lo que permite la repoblación y revascularización de las células huésped. La adición de matrix metalloproteinases (metaloproteinases de la matriz - MMP) a la matriz de tejido potencia además la cicatrización activa.

Las MMP son enzimas dependientes de los iones de metal que son capaces de degradar las proteínas de la matriz extracelular. Las MMP incluyen colagenasas, gelatinasas, estromelinas, matrilisinas, MMP de tipo membrana y otros tipos de MMP. La degradación de la matriz extracelular por las MMP libera moléculas bioactivas procedentes de la matriz. A través de la liberación de estas moléculas bioactivas, las MMP pueden modular los procesos celulares y fisiológicos, incluyendo la morfogénesis, la angiogénesis y la reparación tisular.

La degradación mediada por MMP de la matriz extracelular provoca la liberación de matriquinas, péptidos bioactivos con capacidad para regular la actividad celular. Se sabe que las matriquinas modulan aspectos de la actividad celular, incluyendo la proliferación, adhesión, migración y apoptosis. Las matriquinas también se han visto implicadas en la síntesis y degradación de proteínas. El GHK (tripéptido de glicina-histidina-lisina), por ejemplo, es una matriquina procedente del colágeno que se ha descubierto que influye en la síntesis de colágeno, la proliferación celular y la reparación tisular. Además del colágeno, las fuentes proteicas de matriquinas incluyen, por ejemplo, la elastina y las glicoproteínas del tejido conjuntivo.

En diversas realizaciones de la presente descripción, las MMP se cargan en una matriz de tejido para crear una composición de matriz de tejido con mejor capacidad para la regeneración tisular. Se usa un agente desactivador para inhibir la actividad de las MMP hasta que la composición de matriz de tejido se coloca en el cuerpo, lo que impide la degradación de las proteínas de la matriz extracelular hasta el momento apropiado. Una vez colocada en el interior del cuerpo, las MMP se reactivan automáticamente, lo que provoca la liberación de matriquinas y la consiguiente potenciación del proceso de cicatrización. En resumen, incorporando enzimas degradadoras de la matriz específicas en las matrices de tejido, se puede influir en la cinética de degradación de la matriz para facilitar la cicatrización activa, la integración tisular y la regeneración tisular.

Según ciertas realizaciones, se proporciona un método para preparar una composición de matriz de tejido. El método comprende seleccionar una matriz de tejido a base de colágeno y poner en contacto la matriz con una composición que contiene una enzima, en donde la composición que contiene una enzima contiene además un agente desactivador para reducir la actividad de la enzima. En ciertas realizaciones, se proporciona una composición

de matriz de tejido. La composición comprende una matriz de tejido a base de colágeno, en donde la matriz se ha puesto en contacto con una composición que contiene una enzima, y en donde la composición para contener una enzima contiene además un agente desactivador para reducir la actividad de la enzima. En ciertas realizaciones, se proporciona una matriz de tejido a base de colágeno para usar en un método. El método comprende seleccionar un sitio anatómico para el tratamiento, seleccionar una matriz de tejido a base de colágeno, en donde la matriz se ha puesto en contacto con una composición que contiene una enzima, y en donde la composición que contiene una enzima contiene además un agente desactivador para desactivar la actividad de la enzima.

En la Fig. 1 se proporciona un protocolo de muestra según los métodos descritos. El orden de ciertas etapas se puede modificar según sea necesario. También se pueden añadir ciertas etapas según sea necesario, mientras que otras etapas se pueden omitir. Los detalles específicos en lo que respecta a cada etapa se proporcionan a lo largo de la presente descripción. Se adquiere una matriz de tejido de colágeno procedente de una fuente adecuada 101. Se prepara una solución que contiene las MMP deseadas y los desactivadores 102 de MMP deseados. También se pueden incorporar en la solución estabilizadores de proteínas y radioprotectores. A continuación, se incuba la matriz de colágeno en la solución de MMP para permitir la incorporación de las MMP en la matriz 103. En este caso, las MMP se han desactivado antes de la incorporación en la matriz. De forma alternativa, las MMP, el agente desactivador de MMP y la matriz a base de colágeno se pueden añadir simultáneamente a una solución y dejar que incuben 104. Después de cualquiera de los métodos, la matriz, ahora cargada con MMP desactivadas, se envasa y esteriliza posteriormente mediante irradiación 105. El envasado de la matriz antes de la esterilización reduce la manipulación y mantiene la esterilidad después de la esterilización. El envase esterilizado se almacena a continuación hasta la implantación. La matriz se puede almacenar en un estado hidratado, es decir, en una cantidad adecuada del tampón apropiado 106. En la alternativa, la matriz también se puede almacenar en un estado seco, es decir, liofilizado, hasta su uso posterior 107. En cualquiera de los estados, la matriz se almacena adecuadamente hasta la implantación en un sujeto humano o animal. Tras la implantación, las MMP desactivadas en las matrices serán reactivadas automáticamente por los iones de metal presentes en el sujeto, lo que provocará la liberación de matriquinas que facilitan la reparación tisular.

Los métodos descritos en la presente memoria se pueden usar para producir matrices de tejido activadas por enzimas que utilizan una diversidad de tipos de tejidos, siempre y cuando el tejido incluya una matriz que contiene colágeno susceptible de usar con los métodos descritos en la presente memoria. Dichas matrices pueden incluir tejidos intactos, tejidos que han sido parcial o completamente descelularizados, o matrices colaginosas sintéticas (p. ej., matrices tridimensionales formadas a partir de tejidos suspendidos o procesados de cualquier otra manera).

En diversas realizaciones, la matriz de tejido se puede producir a partir de un abanico de tipos de tejidos. Por ejemplo, la matriz de tejido puede proceder de fascia, tejido pericárdico, duramadre, tejido umbilical, tejido placentario, tejido de válvula cardíaca, ligamentos, tendones, tejido arterial, tejido venoso, tejido conjuntivo neural, tejido de la vejiga urinaria, tejido de uréter y tejido intestinal. En algunas realizaciones, la matriz de tejido comprende una matriz de tejido dérmico. En ciertas realizaciones, la matriz de tejido comprende matriz dérmica porcina.

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

En algunas realizaciones, la matriz a base de colágeno comprende una matriz de tejido acelular. En ciertas realizaciones, las matrices se pueden descelularizar completamente a matrices de tejido acelulares para uso en pacientes. Por ejemplo, se pueden descelularizar completamente diversos tejidos, tales como piel, intestino, hueso, cartílago, tejido nervioso (p. ej., fibras nerviosas o duramadre), tendones, ligamentos, u otros tejidos para producir matrices de tejido útiles para pacientes. En la presente memoria se describen procesos adecuados para producir matrices de tejido acelulares.

Aunque una matriz de tejido acelular se puede fabricar a partir de la misma especie que el receptor del injerto de matriz de tejido acelular, también pueden servir como fuentes de tejido especies diferentes. Por tanto, por ejemplo, una matriz de tejido acelular se puede fabricar a partir de tejido porcino e implantar en un paciente humano. Las especies que pueden servir como receptores de una matriz de tejido acelular y como donantes de tejidos u órganos para la producción de la matriz de tejido acelular incluyen, sin limitación, mamíferos, tales como humanos, primates no humanos (p. ej., monos, babuinos o chimpancés), cerdos, vacas, caballos, cabras, ovejas, perros, gatos, conejos, cobayas, jerbos, hámsteres, ratas, o ratones.

Generalmente, las etapas implicadas en la producción de una matriz de tejido acelular incluyen recoger el tejido de un donante (p. ej., un cadáver humano o una fuente animal) y retirar las células en condiciones que conserven la función biológica y estructural. En ciertas realizaciones, el proceso incluye un tratamiento químico para estabilizar el tejido y evitar la degradación bioquímica y estructural simultáneamente a, o antes de, la retirada de las células. En diversas realizaciones, la solución estabilizadora detiene o impide la degradación osmótica, hipóxica y proteolítica, protege frente a la contaminación microbiana y reduce el daño mecánico que puede producirse con tejidos que contienen, por ejemplo, componentes del músculo liso (p. ej., vasos sanguíneos). La

solución estabilizadora puede contener un tampón apropiado, uno o más antioxidantes, uno o más agentes oncóticos, uno o más antibióticos, uno o más inhibidores de proteasas y/o uno o más relajantes del músculo liso.

5 El tejido se coloca a continuación en una solución de descelularización para retirar las células viables (p. ej., células epiteliales, células endoteliales, células del músculo liso y fibroblastos) de la matriz estructural sin dañar la integridad biológica y estructural de la matriz de colágeno. La solución de descelularización puede contener un tampón, una sal, un antibiótico, uno o más detergentes (p. ej., TRITON X-100™, desoxicolato de sodio, monooleato de polioxietileno (20) sorbitano, uno o más agentes para impedir la reticulación, uno o más inhibidores de proteasas, y/o una o más enzimas. En algunas realizaciones, la solución de descelularización comprende del 0,1 % al 10 % (p/v) de TRITON-X-100™. En otras realizaciones, la solución de descelularización comprende del 0,5 % al 5 % (p/v) de TRITON-TRITON-X-100™. En algunas realizaciones, la solución de descelularización comprende un 1 % de TRITON-X-100™ en medio RPMI con gentamicina y EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 25 mM. En algunas realizaciones, el tejido se incuba en la solución de descelularización durante la noche a 37 °C con agitación suave a 90 rpm. En ciertas realizaciones, detergentes adicionales, la solución de descelularización comprende del 0,1 % al 10 % de desoxicolato de sodio. En otras realizaciones, se añade un 2 % de desoxicolato de sodio a la solución de descelularización.

Se entiende que se pueden realizar variaciones en el protocolo anterior sin que deje de estar dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, se pueden utilizar otros tampones fisiológicos, siempre y cuando no impidan el proceso de descelularización. En algunas realizaciones, los detergentes adecuados pueden incluir, pero no se limitan a, SDS, colato de sodio, desoxicolato de sodio, TRITON-X-100™ y NP40™. Los detergentes seleccionados se pueden usar en un intervalo de concentraciones, por ejemplo, del 0,1 al 10 % (p/v), 0,5 a 2 %, 1 a 2 %, 0,1 a 2 %, 0,5 a 5 %, 0,5 a 10 %, 0,1 a 2 %, o en cualquier valor dentro de esos intervalos.

Después del proceso de descelularización, la muestra de tejido se lava concienzudamente con solución salina. En algunas realizaciones ilustrativas, p. ej., cuando se usa material xenogénico, el tejido descelularizado se trata durante la noche a temperatura ambiente con una solución de desoxirribonucleasa (DNasa). En algunas realizaciones, la muestra de tejido se trata con una solución de DNasa preparada en tampón DNasa (HEPES (ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinatanosulfónico) 20 mM, CaCl₂ 20 mM y MgCl₂ 20 mM). En algunas realizaciones, la solución de DNasa comprende 30 unidades/ml de DNasa. Opcionalmente, se puede añadir una solución de antibiótico (p. ej., gentamicina) a la solución de DNasa. En algunas realizaciones, la solución comprende 50 µg/ml de gentamicina. Puede usarse cualquier tampón adecuado, siempre y cuando el tampón proporcione una actividad de DNasa adecuada.

La eliminación de los epítomos de α-gal del material que contiene colágeno puede reducir la respuesta inmune contra el material que contiene colágeno. El epítomo de α-gal se expresa en mamíferos no primates y en monos del Nuevo Mundo (monos de América del Sur), así como sobre macromoléculas tales como los proteoglicanos de los componentes extracelulares. U. Gallili y col., *J. Biol. Chem.* 263:17755 (1988). Sin embargo, este epítomo está ausente en los primates del Viejo Mundo (monos de Asia y África y simios) y los humanos. *Id.*, los anticuerpos anti-gal se producen en humanos y primates como resultado de una respuesta inmune a las estructuras de carbohidrato del epítomo de α-gal en las bacterias gastrointestinales. U. Gallili y col., *Infect. Immun.* 56:1730 (1988); R.M. Hamadeh y col., *J. Clin. Invest.* 89:1223 (1992).

Puesto que los mamíferos no primates (p. ej., los cerdos) producen epítomos de α-gal, el xenotrasplante de material que contiene colágeno de estos mamíferos en primates con frecuencia provoca rechazo debido a la unión de α-gal de primate a estos epítomos sobre la matriz que contiene colágeno. La unión provoca la destrucción del material que contiene colágeno mediante fijación del complemento y mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. U. Gallili y col., *Immunology Today* 14:480 (1993); M. Sanrin y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11391 (1993); H. Good y col., *Transplant. Proc.* 24:559 (1992); B.H. Collins y col., *J. Immunol.* 154:550 (1995). Además, el xenotrasplante provoca una activación importante del sistema inmune para producir mayores cantidades de anticuerpos contra α-gal de alta afinidad. En consecuencia, en algunas realizaciones, cuando se usan animales que producen anticuerpos contra α-gal como fuente de tejido, la eliminación sustancial de los epítomos de α-gal de las células y de los componentes extracelulares del material que contiene colágeno, y la prevención de la reexpresión de epítomos de α-gal celulares pueden reducir la respuesta inmune contra el material que contiene colágeno asociada a la unión de anticuerpo contra α-gal a los epítomos de α-gal.

Para eliminar los epítomos de α-gal, después de lavar el tejido concienzudamente con solución salina para retirar la solución de DNasa, la muestra de tejido puede someterse a uno o más tratamientos enzimáticos para retirar ciertos antígenos inmunogénicos, si están presentes en la muestra. En algunas realizaciones, la muestra de tejido puede tratarse con la enzima α-galactosidasa para eliminar los epítomos de α-gal, si están presentes en el tejido. En algunas realizaciones, el tratamiento enzimático puede comprender de 50 a 500 U/L de α-galactosidasa preparada en un tampón adecuado. En algunas realizaciones, la muestra de tejido se trata con α-galactosidasa en una concentración de 200 o 300 U/L preparada en tampón fosfato 100 mM a pH 6,0. En otras realizaciones, la concentración de α-galactosidasa se aumenta a 400 U/L para la retirada efectiva de los epítomos de α-gal del tejido recogido. Se puede usar cualquier concentración de enzima y cualquier tampón adecuados, siempre que se consiga una retirada de los antígenos adecuada.

De forma alternativa, en lugar de tratar el tejido con enzimas, se pueden seleccionar como fuente de tejido animales que hayan sido modificados genéticamente para que carezcan de uno o más epítomos antigénicos. Por ejemplo, se pueden seleccionar como fuente de tejido animales (p. ej., cerdos) que hayan sido modificados

genéticamente para que carezcan del resto α -galactosa terminal. Para consultar las descripciones de los animales apropiados, véase la solicitud codependiente de EE. UU. con n.º de serie 10/896.594 y la patente US-6.166.288.

Después de la selección y preparación de la matriz de tejido a base de colágeno, se selecciona una enzima para su incorporación en la matriz. En ciertas realizaciones, la enzima es una matrix metalloproteínase (metaloproteínasa de la matriz - MMP). Las clases de MMP adecuadas incluyen colagenasas, gelatinasas, estromelinas, matrilisinas, MMP de tipo membrana, así como otros tipos de MMP. Las MMP específicas adecuadas para usar con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-18, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-23, MMP-24, MMP-25, MMP-26, MMP-27 y MMP-28. La MMP concreta seleccionada puede depender de las matriquinas deseadas tras la degradación de la matriz extracelular o del proceso celular concreto sobre el que se vaya a influir. En ciertas realizaciones, la MMP comprende MMP-1, MMP-3, o MMP-9, que son colagenasas, estromelinas y gelatinasas, respectivamente. En ciertas realizaciones, se puede incorporar más de un tipo de MMP en la matriz. Incorporando varios tipos de MMP en la matriz de tejido se pueden regular una diversidad de procesos para facilitar además la cicatrización.

También se pueden incorporar enzimas adicionales en la matriz junto con las MMP. Estas enzimas que no son MMP pueden actuar para facilitar la reparación tisular en mayor grado que añadiendo solo MMP. En ciertas realizaciones, las enzimas adicionales incluyen elastasa y dispasa. La elastasa degrada la elastina, otro componente que se encuentra en las matrices extracelulares. La dispasa hidroliza la fibronectina y el colágeno IV, que generalmente no son degradables por las MMP colagenasas.

Como se ha comentado anteriormente, la MMP concreta seleccionada puede serlo en función de la matriquina deseada como resultado de la degradación de la matriz extracelular. El GHK (tripéptido de glicil-histidil-lisina), por ejemplo, es una matriquina procedente del colágeno que es un potente activador de la síntesis y el remodelado de la matriz extracelular. El CNYYSNS (heptapéptido de cisteinil-asparaginil-tirosil-tirosil-seril-asparaginil-serina) inhibe la activación de los leucocitos polimorfonucleares y reduce la capacidad invasiva de las células cancerosas. En ciertas realizaciones de la invención, las matriquinas deseadas pueden incluir GHK, CNYYSNS, VGPVG, VGVAPG, KKGHK y DGGRY. Y.

Se utiliza un agente desactivador para inhibir la actividad de las MMP, lo que impide de este modo la degradación de la matriz extracelular hasta el momento apropiado. Por ejemplo, con el agente desactivador correcto, se puede inhibir la degradación de la matriz de tejido hasta la implantación en un sujeto. Los inhibidores de MMP incluyen inhibidores endógenos, tales como TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4, e inhibidores sintéticos, tales como fosforamidón y bestatina. En ciertas realizaciones, el agente de desactivación de MMP es un quelante. La actividad de las MMP es dependiente de los iones de metal. El agente quelante retira los iones de metal del sitio activo de la MMP, lo que desactiva de este modo la enzima. Sin ceñirnos a la teoría, se cree que las concentraciones de iones de metal presentes de forma natural en el cuerpo son capaces de reemplazar a los iones que han sido secuestrados por el agente quelante, lo que restaura automáticamente de este modo la actividad de la MMP tras la implantación en el cuerpo. Los fluidos del cuerpo también pueden servir para lavar o diluir el agente desactivador, lo que restaura de este modo la actividad de las MMP. En ciertas realizaciones, el agente quelante puede incluir EDTA, EGTA y ortofenantrolina.

El agente desactivador también permite la regulación de la degradación de la matriz de tejido. Se ha descubierto que ciertos tisulares, tales como la submucosa del intestino delgado, se degradan rápidamente cuando se usan *in vivo*, lo que provoca una inflamación inmediata y significativa. A su vez, esto conduce a un remodelado pobre del tejido y a una revascularización inferior a la esperada. El uso de un agente desactivador permite la regulación de la degradación tisular modulando la actividad de las MMP, lo que mitiga tales efectos no deseables.

Para incorporar las enzimas desactivadas en la matriz de tejido seleccionada, se prepara una composición que contiene tanto la enzima, tal como la MMP deseada, como el agente desactivador apropiado, tal como EDTA. En algunas realizaciones, la composición que contiene tanto la enzima como el agente desactivador es una solución. Se puede usar cualquier tampón para preparar la solución, siempre y cuando este permita la desactivación de la enzima por el agente desactivador. En ciertas realizaciones, el tampón comprende tampón HEPES. Otros tampones adecuados incluyen PBS, TBS, MOPS, o cualquier otro tampón biocompatible conocido en la técnica y combinaciones de los mismos. El tampón se puede encontrar en concentraciones que varían de 1 a 100 mM (p. ej., 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 mM) en la solución.

Se puede ajustar la cantidad de enzima en la solución para controlar la velocidad a la que se digieren las proteínas de la matriz de tejido, en algunas realizaciones, las concentraciones adecuadas de enzima en solución varían de 0,2 U/mL a 2,0 U/mL (p. ej., 0,2; 0,5; 0,8; 1,0; 1,2; 1,5; 1,8 o 2 U/mL).

También se puede ajustar la cantidad de agente desactivador en la solución para modular la velocidad de digestión de las proteínas. En ciertas realizaciones, las concentraciones adecuadas de agente quelante, por ejemplo, EDTA, en solución varían de 4 a 20 mM de EDTA (p. ej., EDTA 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 mM).

En algunas realizaciones, la solución también puede contener una sal. En ciertas realizaciones, la cantidad de sal presente en la solución sirve para reactivar la actividad enzimática proporcionando iones metálicos. Controlando las cantidades relativas de sal, agente desactivador y enzima presentes en la solución, se puede modular además la velocidad de

degradación tisular. Las sales adecuadas incluyen, pero no se limitan a, dihidrogenofosfato de calcio, sulfato de calcio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, sulfato de magnesio, cloruro de manganeso, sulfato de manganeso. La concentración de sal en la solución puede variar de 2 a 10 mM (p. ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mM) en la solución.

5 La composición que contiene la enzima y el agente desactivador también puede incluir estabilizadores de proteínas y radioprotectores. En ciertas realizaciones, los estabilizadores de proteínas adecuados incluyen glicerol, propilenglicol, etilenglicol, manitol, sucrosa, trehalosa o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la concentración de estabilizadores de proteínas en solución puede variar de 5 a 250 mM (p. ej., 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 10 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245 y 250 mM). En ciertas realizaciones, los radioprotectores adecuados incluyen glicerol, propilenglicol, manitol, trehalosa o cualquier combinación de los mismos. Los radioprotectores pueden variar en su concentración de 5 a 250 mM (p. ej., 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 15 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245 y 250 mM) en solución.

15 A continuación, la matriz de tejido se pone en contacto con la composición que contiene la enzima y el agente desactivador. En ciertas realizaciones, la matriz de tejido se coloca en la solución que contiene la enzima y el agente desactivador. En este caso, las enzimas se han desactivado antes de colocar la matriz de tejido en la solución. Las enzimas desactivadas se incorporan a continuación en la matriz de tejido a medida que esta se 20 incuba dentro de la solución. En otras realizaciones, la matriz de tejido, la enzima deseada y el agente desactivador apropiado se colocan en un tampón adecuado al mismo tiempo y se deja que incuben.

En diversas realizaciones, los métodos descritos pueden comprender el procesamiento adicional de la matriz de tejido. Tal procesamiento puede incluir la desinfección o esterilización de la matriz de tejido. En algunas 25 realizaciones, la matriz de tejido se esteriliza con alcohol isopropílico (IPA) (p. ej., IPA a aproximadamente el 70 %).

La matriz de tejido descrita se puede tratar además para producir materiales asépticos o estériles. En consecuencia, en diversas realizaciones, las matrices se pueden esterilizar después de la preparación y junto con el envasado de 30 las matrices. Como se usa en la presente memoria, un “proceso de esterilización” puede incluir cualquier proceso que reduzca la carga biológica en una muestra, pero no necesita volver la muestra absolutamente estéril.

Ciertos procesos ilustrativos incluyen un proceso de irradiación gamma, un proceso de irradiación con haz de 35 electrones, tratamiento con óxido de etileno y tratamiento con óxido de propileno. Los procesos de esterilización adecuados incluyen los descritos en, por ejemplo, la patente de EE. UU. con n.º de publicación 2006/0073592A1, de Sun y col.; la patente US-5.460.962 de Kemp; la patente de EE. UU. con n.º de publicación 2008/0171092A1, de Cook y col. En algunas realizaciones, la esterilización se realiza junto con el envasado del dispositivo, mientras que, en otras realizaciones, la esterilización puede producirse después del envasado.

Después de que las matrices se han preparado mediante los métodos descritos, se pueden almacenar durante 40 algún tiempo antes de la implantación en, o sobre, un paciente. En ciertas realizaciones, la matriz se puede envasar en una bolsa de TYVEK® para su almacenamiento. La matriz también se puede almacenar en diferentes estados, por ejemplo, en un estado húmedo o un estado liofilizado.

En algunas realizaciones, la matriz se liofiliza después de su preparación. La esterilización terminal mediante 45 radiación ionizante después de la liofilización, sin embargo, puede dañar potencialmente el tejido liofilizado. Para minimizar este daño, el material procesado puede envasarse primero húmedo en bolsas de TYVEK® permeables a la humedad. A continuación, se irradia el tejido en un estado húmedo. Después de la irradiación, las muestras húmedas pueden liofilizarse para su almacenamiento.

50 La matriz de tejido preparada mediante los métodos descritos anteriormente puede usarse de diversas maneras para facilitar la reparación, el recrecimiento y la regeneración tisular. En consecuencia, se proporciona una matriz de tejido a base de colágeno para usar en un método. El método comprende seleccionar un sitio anatómico para el tratamiento, seleccionar una matriz de tejido a base de colágeno, en donde la matriz se ha puesto en contacto con una composición que contiene una enzima, y en donde la composición que contiene una enzima contiene además un agente desactivador 55 para desactivar la actividad de dicha enzima, e implantar la matriz de tejido a base de colágeno en el sitio de tratamiento. “En”, como se usa en la presente memoria, también significa “sobre.” Como se ha comentado anteriormente, la actividad enzimática de las matrices de tejido descritas se ha inhibido antes de la implantación en un sujeto, es decir, un paciente humano o animal. Una vez implantadas, los iones de metal presentes en el sujeto son capaces de restaurar la actividad de las MMP suprimida por el agente quelante. Con la actividad de las MMP restaurada, comienza la degradación de la matriz de tejido, se liberan matriquinas y se facilita el proceso de cicatrización. 60

Los expertos en la técnica pueden identificar fácilmente un sitio anatómico para el tratamiento, es decir, un sitio de 65 tratamiento. Los ejemplos incluyen, tejido tenso o desgarrado, o tejido que tiene un hueco, agujero o algún otro defecto. Las circunstancias en las que se puede usar la matriz de tejido descrita incluyen en un método de utilización en el tratamiento de lumpectomías, úlceras por presión, úlceras del pie diabético, o defectos del hueso perióstico. La

matriz de tejido también se puede usar en un método de utilización en el tratamiento de defectos faciales, incluyendo arrugas, pérdida de piel o atrofodermia. Los expertos en la técnica pueden identificar fácilmente usos adicionales.

Las matrices de tejido se pueden implantar en, o sobre, una diversidad de sitios anatómicos diferentes. Por ejemplo, las matrices de tejido se pueden implantar alrededor de implantes de mama; alrededor de, o sustituyendo, estructuras vasculares; alrededor de, o sustituyendo, estructuras lumenales (p. ej., uréteres, nervios, tejidos linfáticos, estructuras gastrointestinales); sobre, o sustituyendo, válvulas cardíacas, pericardio u otras estructuras cardíacas; en, o sobre, materiales óseos o cartilaginosos (p. ej., oídos, narices, superficies articulares, alrededor de estructuras dentales, o a lo largo de cualquier hueso corto o largo); y/o circundando, revistiendo, soportando o sustituyendo cualquier cavidad corporal (p. ej., vejiga, estómago).

En ciertas realizaciones, se añade una sustancia bioactiva a la matriz de tejido que facilita además la reparación, el recrecimiento o la regeneración tisular. La sustancia bioactiva puede añadirse a la matriz de tejido en cualquier momento previo al implante de la matriz de tejido en un sujeto. Por ejemplo, puede añadirse una sustancia bioactiva durante la preparación de la matriz, pero antes de su almacenamiento. En otras realizaciones, puede añadirse una sustancia bioactiva al dispositivo después de su almacenamiento, pero inmediatamente antes de la implantación en un sujeto. Las sustancias bioactivas incluyen agentes antimicrobianos, citoquinas, factores de crecimiento, agentes antiinflamatorios, esteroides, corticoesteroides. En algunas realizaciones, las sustancias bioactivas pueden incluir diversos tipos de tejido, por ejemplo, tejido adiposo.

En algunas realizaciones, las sustancias bioactivas comprenden células que facilitan la reparación el recrecimiento o la regeneración tisular. En ciertas realizaciones, las matrices de tejido pueden sembrarse con células madre, tales como células madre mesenquimales, incluyendo células madre embrionarias y células madre adultas recogidas de la médula espinal, tejido adiposo y células neuronales. En otras realizaciones, se pueden usar células madre autólogas. En algunas realizaciones, se pueden presembrar células alogénicas en los injertos, cultivar *in vitro* y lisar antes de la implantación.

Ejemplo 1: Preparación de porcine acellular dermis matrix (matriz dérmica acelular porcina - pADM)

Se recogieron pieles de porcino frescas y se retiró el pelo. Se obtuvo tejido dérmico de 1,5 mm de espesor a partir de estas pieles retirando la capa de epidermis y la capa de grasa subcutánea (hipodermis). El tejido dérmico se descontaminó a continuación en PBS que contenía 50 unidades/ml de penicilina, 1,25 µg/ml de anfotericina B y 50 µg/ml de estreptomina durante 24 horas a 37 °C.

El procesamiento posterior del tejido se realizó en condiciones asépticas. La dermis separada se descelularizó incubando el tejido en tampón HEPES 10 mM (pH 8,0) que contenía un 2 % de desoxicolato de sodio y EDTA 10 mM durante 24 horas a temperatura ambiente y con agitación leve. La dermis porcina descelularizada se lavó dos veces incubando el tejido en tampón HEPES 10 mM que contenía EDTA 5 mM (pH 7,3) durante 60 minutos por lavado. La dermis se incubó a continuación durante 24 horas en tampón HEPES que contenía MgCl₂ 2 mM, CaCl₂ 2 mM, 1,0 mg/L de DNasa y 1 mg/L de α-galactosidasa para retirar los epítomos de α-gal y otros restos no deseables. Los residuos celulares y los productos químicos residuales se retiraron lavando en PBS (pH 7,5) con agitación suave 5 veces a lo largo de un período de 48 horas. La densidad de la porcine acellular dermis matrix (matriz dérmica acelular porcina - pADM) fue de aproximadamente 0,28 g de tejido seco por centímetro cúbico. Las láminas de pADM tuvieron un espesor final de aproximadamente 2,0 mm debido al hinchamiento del tejido después del procesamiento. Las láminas de pADM se congelaron a continuación a -20 °C hasta su uso posterior.

Ejemplo 2: Degradación *in vitro* de pADM por MMP-1

Las láminas de pADM se descongelaron a 37 °C en baño de agua. Después de descongelar, se prepararon discos de tejido a partir de las láminas usando una aguja de biopsia de 8 mm. A continuación, se colocaron uno o tres discos de pADM en tubos de microcentrífuga de 2 ml. La degradación *in vitro* de pADM por MMP-1 se realizó incubando los discos a 37 °C en 1,5 ml de tampón HEPES 20 mM (pH 7,4) que contenía CaCl₂ 5 mM y 0,01, 0,1, 1,0 o 10 unidades/ml de MMP-1. También se añadió azida de sodio (NaN₃) a la solución de reacción en una concentración final del 0,01 % como antimicrobiano.

El contenido de amina libre en la solución de reacción se usó para medir la degradación *in vitro* de pADM resultante de la actividad de la MMP-1. Después de 16 horas, se retiró una alícuota de 25 µL de la solución de reacción a un tubo de microcentrífuga de 2 ml y, posteriormente, se diluyó con 475 µL de solución de bicarbonato de sodio 100 mM que contenía EDTA 5 mM. A continuación, se añadieron 250 µl de ácido picrilsulfónico (PSA) al 0,05 % y se mezclaron en la muestra, que se incubó a continuación durante 45 minutos a 37 °C. Después de la incubación, se añadieron 250 µl de SDS al 10 % y 125 µl de HCl 1 N en cada muestra.

El contenido de amina libre se midió a 345 nm mediante espectrofotómetro, usando glicina como patrón. Los experimentos se repitieron por triplicado y se registraron los resultados como media ± desviación estándar. La cantidad de aminas libres liberadas de la pADM a diferentes concentraciones de MMP-1 se muestra en la Fig. 2. Incluso a concentraciones de MMP-1 bajas, próximas a las condiciones fisiológicas (0,01 y 0,1 unidades/ml), se detectó un aumento considerable de aminas libres en la solución de reacción, lo que demuestra la idoneidad del ensayo para pruebas *in vitro*.

La cinética de la degradación de pADM por MMP-1 a lo largo de un período de 144 horas se muestra en la Fig. 3A. Como se determina mediante la liberación de aminas libres, no se observó degradación de la pADM con el grupo de control (0 unidades/ml de MMP-1). Sin embargo, a medida que la concentración de MMP-1 aumentaba, la velocidad de degradación de la pADM también aumentaba proporcionalmente. El ensayo siguió demostrando una sensibilidad significativa. A una concentración de MMP-1 de 0,1 unidades/ml, por ejemplo, se detectó un aumento pequeño, pero estable, en el contenido de aminas libres, que correspondía a una degradación de aproximadamente el 3 % de pADM. En la Fig. 3B, se muestra la cinética de degradación a lo largo de un período de 44 horas con resultados similares.

Ejemplo 3: Desactivación de la MMP-1

Se usó EDTA como “conmutador reversible” para controlar la actividad de la MMP-1 en la pADM. Como quelante, el EDTA puede secuestrar iones de calcio y magnesio dentro de la pADM, lo que inhibe de este modo la actividad de la MMP-1. Se incubaron discos de tejido a 37 °C en 1,5 ml de solución de reacción (pH 7,4) que contenía HEPES 20 mM, CaCl₂ 5 mM y 10 unidades/ml de MMP-1. También se añadió EDTA a la solución de reacción para detener la degradación. Después de 72 horas de incubación, se midió el contenido de aminas libres en la solución de reacción usando el ensayo con PSA descrito en el Ejemplo 2.

La adición de EDTA a la solución de reacción provocó la supresión de la actividad de la MMP-1. Como se muestra en la Fig. 4A, ya no se detectaba actividad de MMP-1 cuando la concentración de EDTA era superior a la concentración de CaCl₂. El efecto del EDTA (10 mM) sobre la actividad de la MMP-1 también se probó en otras concentraciones de MMP-1. Como se muestra en la Fig. 4B, el EDTA 10 mM inhibió la actividad de la MMP-1 a concentraciones de MMP-1 de 1,0 unidades/ml e inferiores.

Ejemplo 4: Reactivación de la MMP-1 desactivada

Se cargaron muestras de matriz pADM con MMP-1 preparada a concentraciones de 1, 5 o 30 unidades/ml en tampón HEPES (pH 7,4). Se añadió EDTA a cada muestra en una concentración final de 2,0 mM para desactivar la MMP-1. Las muestras se incubaron a continuación a 4 °C durante la noche para permitir que la MMP-1 se infiltrara en la matriz de tejido. A continuación, se midió la actividad de la MMP-1 en los discos de tejido a 37 °C en solución de HEPES (pH 7,4) 20 mM fresca, con y sin CaCl₂ 2 mM. Como se muestra en la Fig. 5, la adición de iones de calcio restauró la actividad de la MMP-1 suprimida, lo que fue indicado por el mayor contenido de aminas libres en la solución de HEPES.

Ejemplo 5: Preparación de human acellular dermis matrix (matriz dérmica acelular humana - hADM)

Se obtuvo piel de donante humano a partir de un banco de tejidos estadounidense certificado y con el consentimiento apropiado. La piel adquirida se envió al lugar de ensayo en solución de RPMI 1640 que contenía antibióticos (penicilina y estreptomycin) en presencia de hielo. Tras su llegada, la piel se criopreservó a -80 °C.

El tejido cutáneo se procesó en condiciones asépticas. La piel congelada se descongeló a 37 °C, retirando toda traza visible de hielo. La epidermis se separó de la dermis incubando el tejido cutáneo en cloruro de sodio 1,0 M con TRITON X-100™ al 0,5 % (p/v) durante 24 horas a temperatura ambiente. Los elementos celulares de la dermis se retiraron incubando el material de dermis en tampón HEPES 10 mM (pH 8,0) que contenía desoxicolato de sodio al 2 % (p/v) y EDTA 10 mM durante 18 horas y, a continuación, lavando el material en PBS (pH 7,5) con agitación suave 5 veces a lo largo de un período de 48 horas. Las láminas de human acellular dermis matrix (matriz dérmica acelular humana - hADM) tenían una densidad de aproximadamente 0,15 g de masa de tejido seco por centímetro cúbico y eran de aproximadamente 2,0 mm de espesor. Las láminas de hADM se congelaron posteriormente a -20 °C hasta su uso.

Ejemplo 6: Degradación *in vitro* de hADM por MMP-1

Las láminas de hADM se descongelaron a 37 °C en baño de agua. Después de descongelar, se prepararon discos de tejido a partir de las láminas usando una aguja de biopsia de 8 mm y se incubaron en 1,5 ml de solución de reacción (HEPES 20 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 7,4). Las muestras de ensayo se prepararon añadiendo MMP-1 a las soluciones de reacción en concentraciones finales de 0, 0,1 y 1,0 unidades/ml. Después de incubar las muestras a 37 °C durante 40 horas, se midió el contenido de aminas libres en las muestras usando el ensayo con PSA descrito anteriormente. La cantidad de aminas libres que fueron liberadas de la hADM se muestra en la Fig. 6A. No se detectaron aminas libres en la solución de muestra de control (0 unidades/ml de MMP-1). Se observó un aumento en la cantidad de aminas libres a concentraciones superiores de MMP-1.

Para el estudio de reactivación, se incubaron discos de tejido de hADM en 2,0 ml de tampón HEPES que contenía 5 unidades/ml de MMP-1 y EDTA 2 mM a 4 °C durante la noche. Después de la incubación, los discos de hADM que contenían MMP-1 desactivada se dividieron en dos grupos. En el primer grupo, los discos de tejido se colocaron en 1,5 ml de HEPES 20 mM (pH 7,4) con CaCl₂ 2 mM. En el segundo grupo, los discos de tejido se colocaron en 1,5 ml de HEPES 20 mM (pH 7,4) sin CaCl₂. Los viales que contenían las muestras se incubaron a 37 °C con agitación suave. Las concentraciones de amina libre en las soluciones de muestra se midieron después de 24, 48 y 96 horas. Como se muestra en la Fig. 6B, la actividad se restauró con la adición de CaCl₂ 2 mM y aumentó de una manera dependiente del tiempo.

Ejemplo 7: Efecto del tratamiento con MMP-1 sobre las propiedades mecánicas de la pADM

Se cortó una lámina de pADM preparada según el Ejemplo 1 en tiras de 0,8 cm x 6,0 cm con un bisturí. Para reducir el error experimental, todas las tiras de tejido se cortaron en la misma dirección. Las tiras se agruparon en conjuntos de tres y se colocaron en tubos cónicos de 15 mL individuales. El tratamiento *in vitro* se realizó a 37 °C en tampón HEPES 20 mM (pH 7,4) que contenía CaCl₂ 5 mM. Las tiras de pADM se sumergieron en 12 mL de la solución de HEPES con 1 unidad/ml de MMP-1. Se añadió azida de sodio (NaN₃) a la solución de reacción en una concentración final del 0,01 % como antimicrobiano. El tratamiento con MMP-1 se terminó transfiriendo las tiras de pADM a tampón HEPES 20 mM que contenía EDTA 10 mM a las 48 horas, 96 horas y 144 horas, respectivamente. Tras retirar las tiras, se recogió el tampón y se determinaron los niveles de amina libre usando el procedimiento de ensayo descrito en el Ejemplo 2. Se realizaron ensayos de tracción sobre las tiras de tejido de pADM en las condiciones de ensayo siguientes: célula de carga de 1 KN, longitud de referencia de 4 mm y velocidad de la cruceta de 1,0 mm/min.

Como se muestra en la Fig. 7A, la cantidad de amina libre en la solución aumentó con la duración del tratamiento con MMP-1, lo que demuestra la degradación continua de la pADM a lo largo del tiempo. Como se muestra en la Fig. 7B, las propiedades mecánicas de la pADM no cambiaron tras la degradación de la pADM. Después de un tratamiento de 96 horas con 1 unidad/ml de MMP-1, no se observó un cambio significativo para los tres parámetros medidos, elasticidad, tensión última de rotura y deformación última de rotura. Sin embargo, cuando se aumentó el tiempo de tratamiento a 144 horas, se descubrió una caída significativa en la elasticidad y la tensión última de rotura en comparación con la pADM sin tratamiento con MMP-1. Como se muestra en la Fig. 7B, no se observó un cambio significativo en la deformación última de rotura tras el tratamiento con MMP-1 como resultado del tiempo.

Ejemplo 8: Efecto del tratamiento con MMP-1 sobre la estabilidad térmica de la pADM

Se prepararon discos de pADM usando una aguja de biopsia de 5,0 mm. Los discos se incubaron a continuación en grupos de tres en 1,5 ml de tampón de reacción (HEPES 20 mM, CaCl₂ 5 mM, 0,01 NaN₃, pH 7,4) que contenía 0, 0,5 o 1,5 unidades/ml de MMP-1. A las 0, 48, 96 y 144 horas de la incubación, los discos de tejido en un tubo de cada nivel de concentración se transfirieron a tampón HEPES 20 mM que contenía EDTA 10 mM para extinguir la actividad de la MMP-1. El tampón de reacción restante se usó para la determinación de amina libre como se describe en el Ejemplo 2. La Fig. 8 muestra la degradación de la pADM en base a la liberación de amina libre tras la adición de MMP-1 en concentraciones de 1,5 y 0,5 unidades/ml. La liberación de aminas libres aumentó proporcionalmente con el tiempo de tratamiento, lo que indica que la degradación de pADM mediada por enzimas es un proceso estable. Se detectaron cantidades muy limitadas de amina libre en el grupo sin MMP-1.

El efecto de la degradación por MMP-1 sobre la estabilidad de la matriz de tejido se investigó usando un differential scanning calorimeter (calorímetro diferencial de barrido - "DSC") (Q100, TA Instruments, New Castle, DE). Los discos de tejido descritos anteriormente se equilibraron en PBS durante al menos 3 horas. A continuación, los discos de tejido se secaron con papel Kimwipe®. Después, los discos de tejido secados con papel se sellaron herméticamente en un crisol de aluminio para DSC. Todas las muestras se sometieron a barrido a una velocidad de calentamiento de 2 °C min⁻¹ de 2 °C a 120 °C con nitrógeno como gas de purga. Después de la medición por DSC, se crearon pequeños agujeros sobre las tapas de los crisoles sellados, los cuales se secaron a continuación entre 105 °C y 110 °C al vacío durante la noche. La masa seca de las muestras se midió a continuación en base a la masa del crisol. Los termogramas se analizaron usando el programa Universal Analysis para determinar la temperatura de inicio (T_d) y la entalpía de la desnaturalización del colágeno. Como se muestra en la Fig. 9A, no se observó una diferencia significativa de los termogramas de DSC obtenidos a partir de pADM tratada con 1,5 unidades/ml de MMP-1 para los diferentes períodos de tiempo. Ni la temperatura de inicio de la desnaturalización ni la entalpía de la desnaturalización del colágeno mostraron un cambio sustancial. Como se muestra en la Fig. 9B, no se observaron diferencias significativas usando DSC para pADM tratadas con diferentes concentraciones de MMP-1 a las 144 horas. Estos resultados indican que lo más probable es que la degradación de pADM mediada por MMP-1 sea una degradación general de las fibras de colágeno, en lugar de la de componentes específicos de la matriz de tejido.

Ejemplo 9: Degradación de pADM usando MMP-3 y MMP-9

Primero, se incubaron MMP-3 y MMP-9 recombinantes (Sigma, EE. UU.) con acetato 4-aminofenilmercúrico ("APMA") 1 mM durante 4 horas a 37 °C para activar las MMP. De nuevo, se usaron discos de pADM de 8 mm para ensayar la degradación mediada por MMP. Los discos de tejido se incubaron en grupos de tres en 1,5 ml de tampón de reacción (HEPES 20 mM, CaCl₂ 5 mM, NaN₃ al 0,01 %, pH 7,4) que contenía 0,5 µg/ml de MMP-3 o MMP-9. Después de 24 y 48 horas de incubación a 37 °C, se tomaron alícuotas de 25 µl de cada tubo para determinar los niveles de amina libre resultantes de la degradación mediada por MMP-3 o MMP-9. Los resultados de amina libre para ambos períodos de incubación, de 24 y 48 horas, muestran que no se encontró amina libre detectable en los tampones de reacción de MMP-3 o MMP-9. Ni la MMP-3 ni la MMP-9 digieren el colágeno tipo I, que es el componente primario de la pADM. Por lo tanto, cabe esperar que no se observara un aumento sustancial en la amina libre después del tratamiento con estas enzimas.

Ejemplo 10: Cambio en la estabilidad térmica de la pADM después de la implantación subcutánea

5 Se fabricaron tres preparaciones de pADM y se implantaron subcutáneamente en ratas: TA1, tejido firme procedente de la región espinal de cerdo; TA2, tejido firme procedente de la región espinal de cerdo que se secó y posteriormente se rehidrató; y TA3, tejido flexible procedente de vientre de cerdo. Después de 20 días, se recogieron las preparaciones de pADM y se limpió cuidadosamente el tejido animal que circundaba la pADM usando fórceps. A continuación, se obtuvieron discos de 5 mm de la pADM explantada usando una aguja de biopsia y se secaron con papel Kimwipe®. Una vez secos, los discos de tejido se sellaron herméticamente en un crisol de aluminio para DSC. Se llevaron a cabo mediciones por DSC para todos los explantes usando los mismos parámetros descritos en el Ejemplo 8. Los termogramas se analizaron usando el programa Universal Analysis para determinar la temperatura de inicio (T_o), la temperatura de desnaturalización (T_d) y la entalpía de la desnaturalización del colágeno (ΔH). El análisis térmico posterior indicó que no se producía ningún cambio significativo en base a cualquier cambio en la composición. Se cree que la mayor parte de pADM no se remodeló en las ratas, ya que las curvas de DSC mostraron solo ligeras diferencias entre los diferentes grupos, como se muestra en la Fig. 10A. Además, la Fig. 10B muestra que, a pesar de que las diferencias de temperatura de inicio y temperatura de desnaturalización entre los tres grupos fueron leves en general, las temperaturas de inicio y desnaturalización eran estadísticamente superiores para TA3. No se observaron diferencias significativas entre los tres grupos con respecto a la entalpía. En conjunto, esto indica que el remodelado tisular puede ser muy lento *in vivo*, lo que plantea una necesidad de remodelado rápido a través de la activación enzimática.

10

15

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar una matriz de tejido que comprende:
- 5 seleccionar una matriz de tejido a base de colágeno intacto; y
- poner en contacto la matriz intacta con una composición para incorporar una o más enzimas desactivadas en la matriz de tejido intacto, dicha composición que contiene al menos una enzima seleccionada de MMP-1, MMP-2 y MMP-9 y un agente quelante que desactiva cada una de la al menos una enzima seleccionada.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en donde la matriz de tejido intacto comprende una matriz de tejido acelular intacto.
3. El método de la reivindicación 2, en donde la matriz de tejido acelular intacto comprende una matriz dérmica acelular intacta.
- 15 4. El método de la reivindicación 2, en donde la matriz de tejido acelular intacto comprende una matriz dérmica porcina acelular intacta.
- 20 5. El método de la reivindicación 1, en donde la composición comprende una enzima adicional.
6. El método de la reivindicación 5, en donde la enzima adicional comprende una MMP, una elastasa, o una dispasa.
- 25 7. El método de la reivindicación 1, en donde el agente quelante comprende EDTA, EGTA, u ortofenantrolina.
8. El método de la reivindicación 1, que además comprende exponer la matriz de tejido intacto a un desinfectante.
9. El método de la reivindicación 8, en donde el desinfectante es alcohol isopropílico.
- 30 10. El método de la reivindicación 1, que además comprende esterilizar la matriz de tejido intacto.
11. El método de la reivindicación 10, en donde la esterilización de la matriz de tejido intacto comprende la aplicación de óxido de etileno, óxido de propileno, irradiación gamma, o irradiación con haz de electrones.
- 35 12. El método de la reivindicación 1, que comprende añadir una sustancia bioactiva a la matriz de tejido intacto.
13. El método de la reivindicación 12, en donde la sustancia bioactiva comprende un agente antibacteriano, una citoquina, un factor de crecimiento, tejido no colaginoso, o células.
- 40

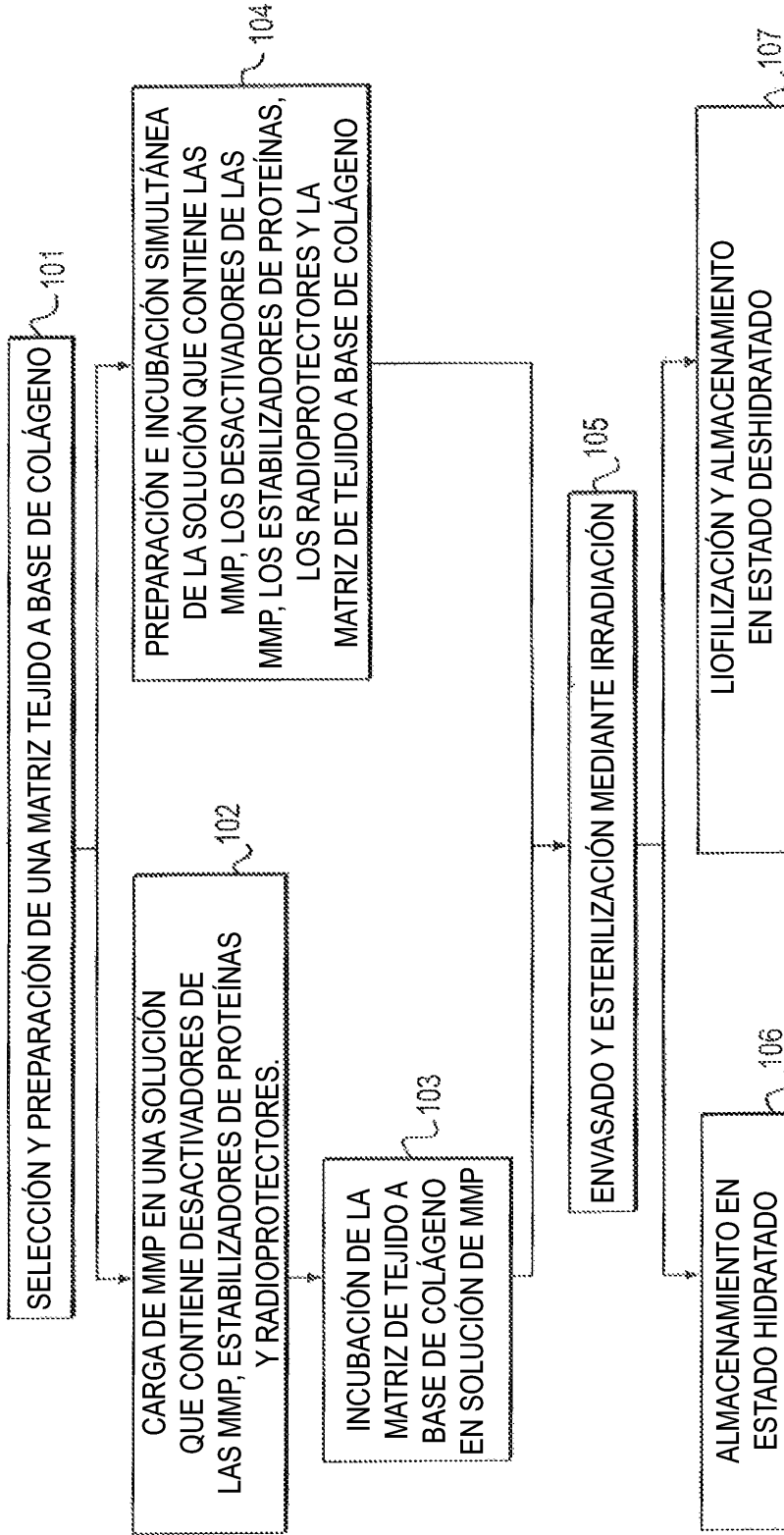


FIG. 1

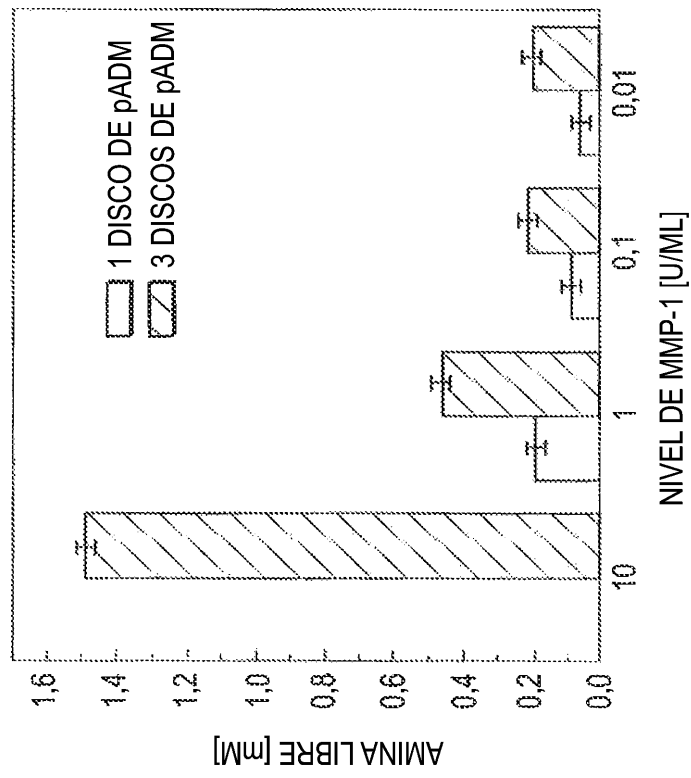


FIG. 2

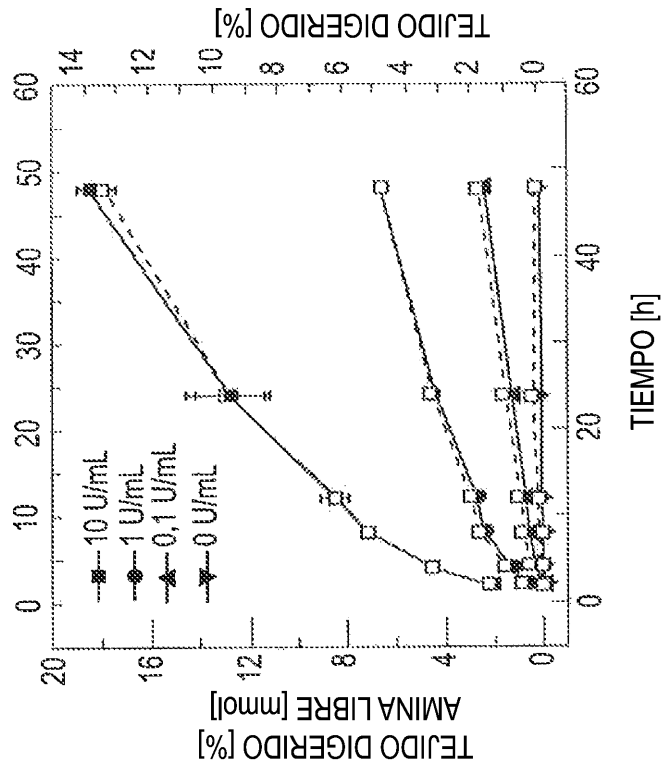


FIG. 3B

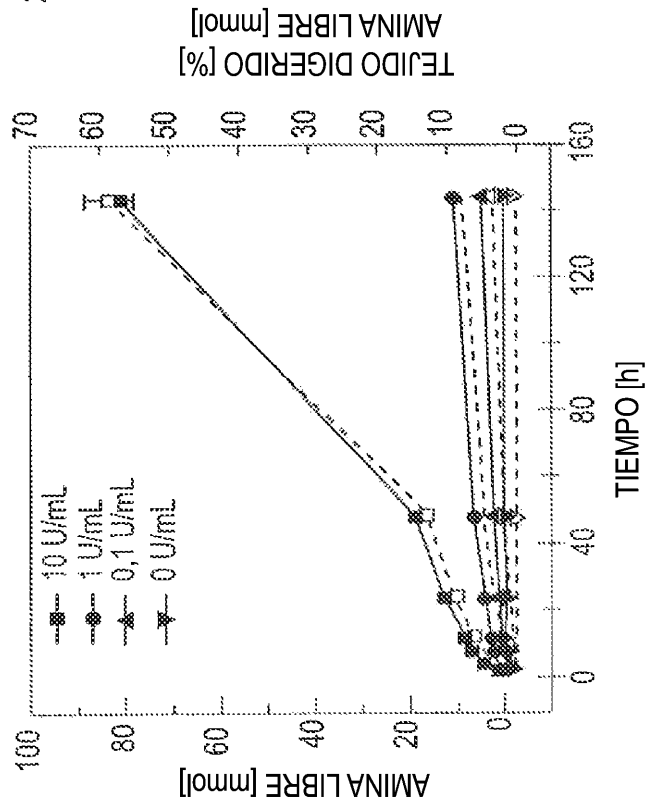


FIG. 3A

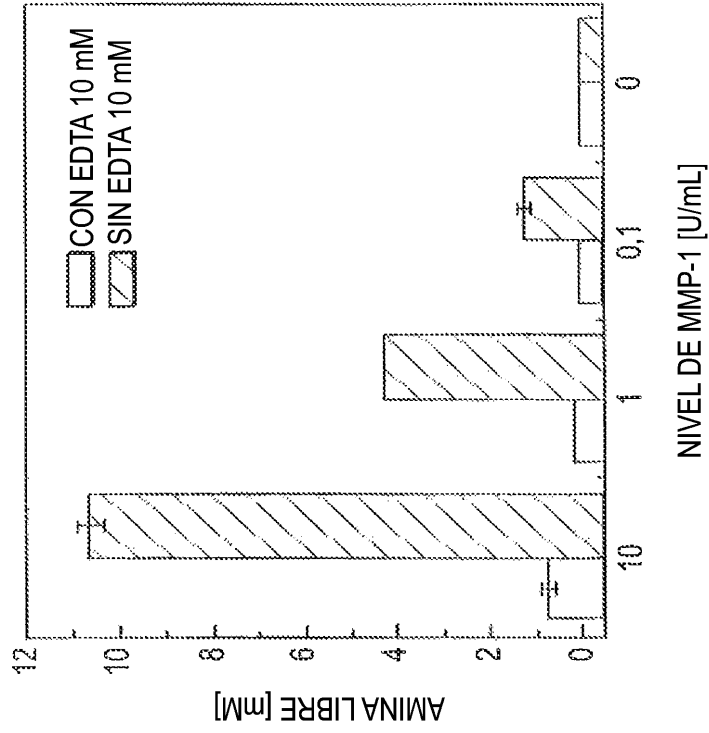


FIG. 4B

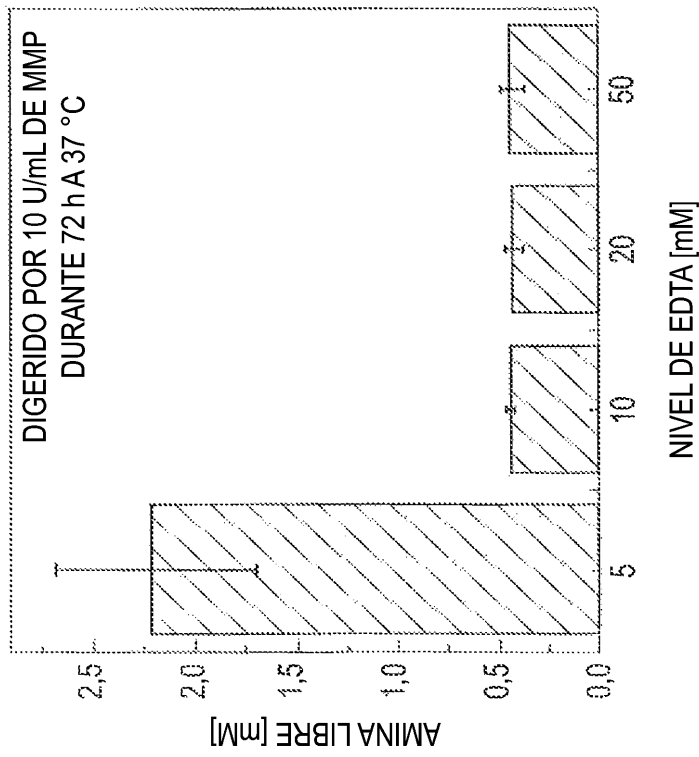


FIG. 4A

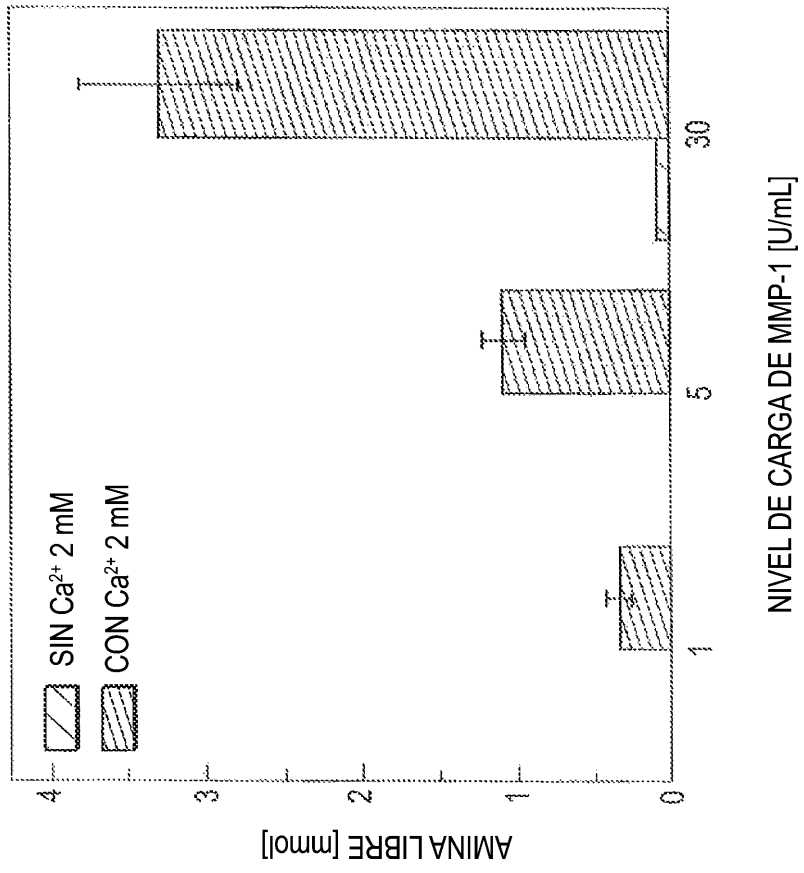


FIG. 5

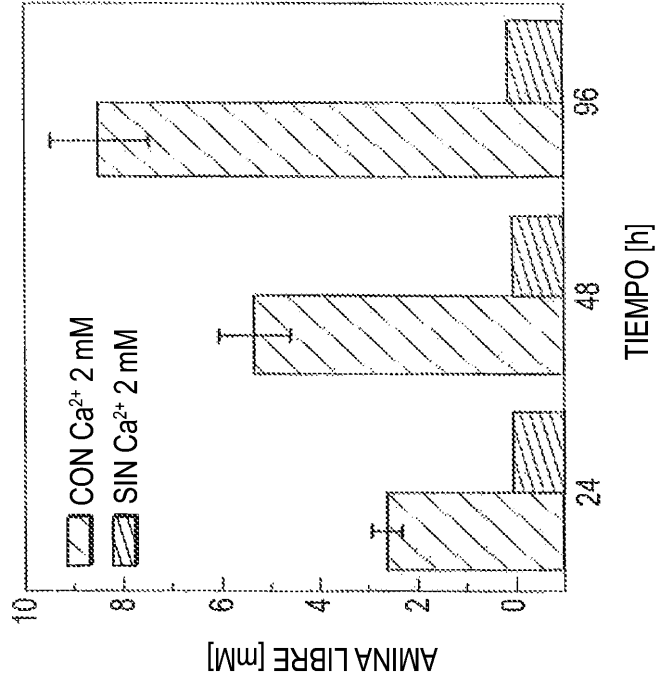


FIG. 6B

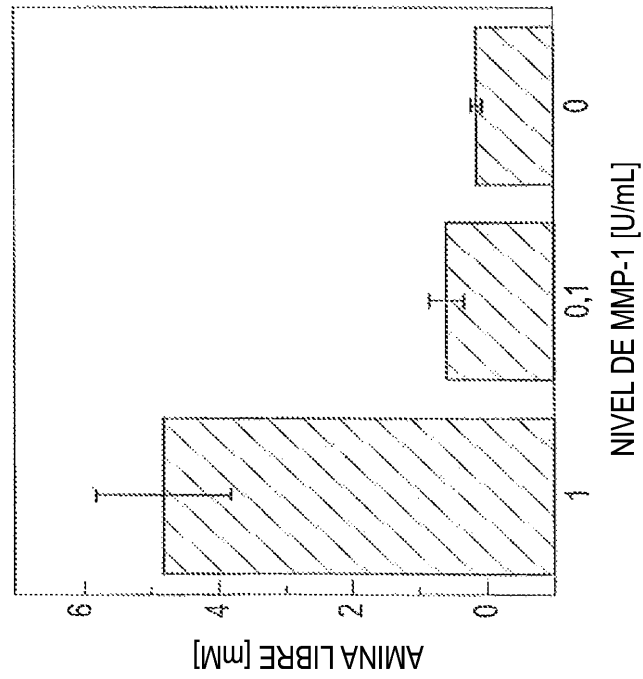


FIG. 6A

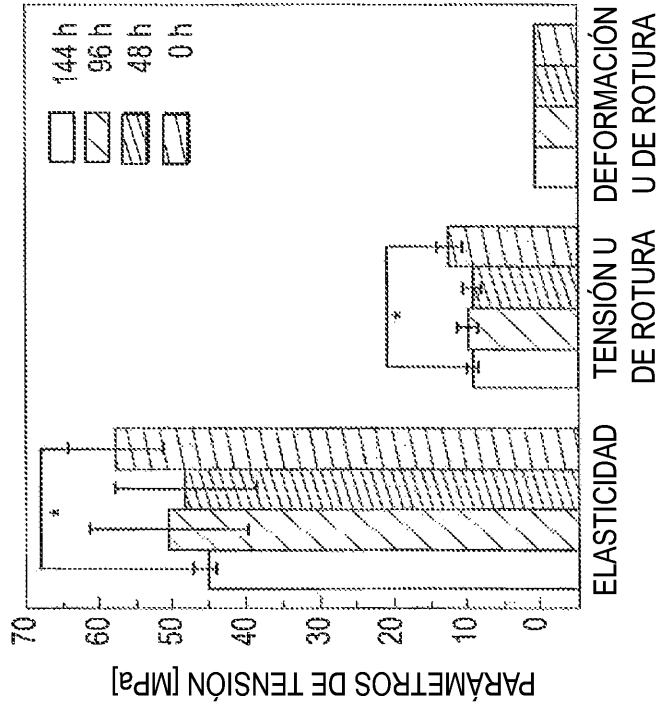


FIG. 7B

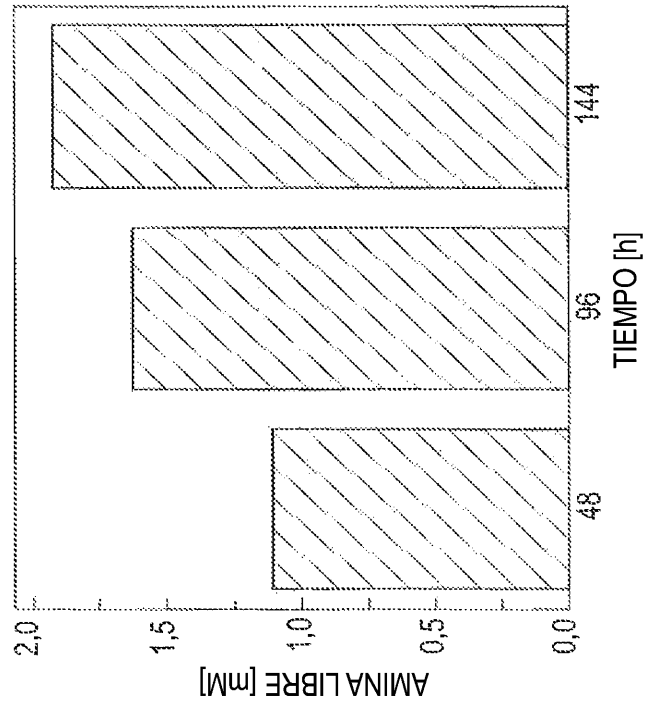


FIG. 7A

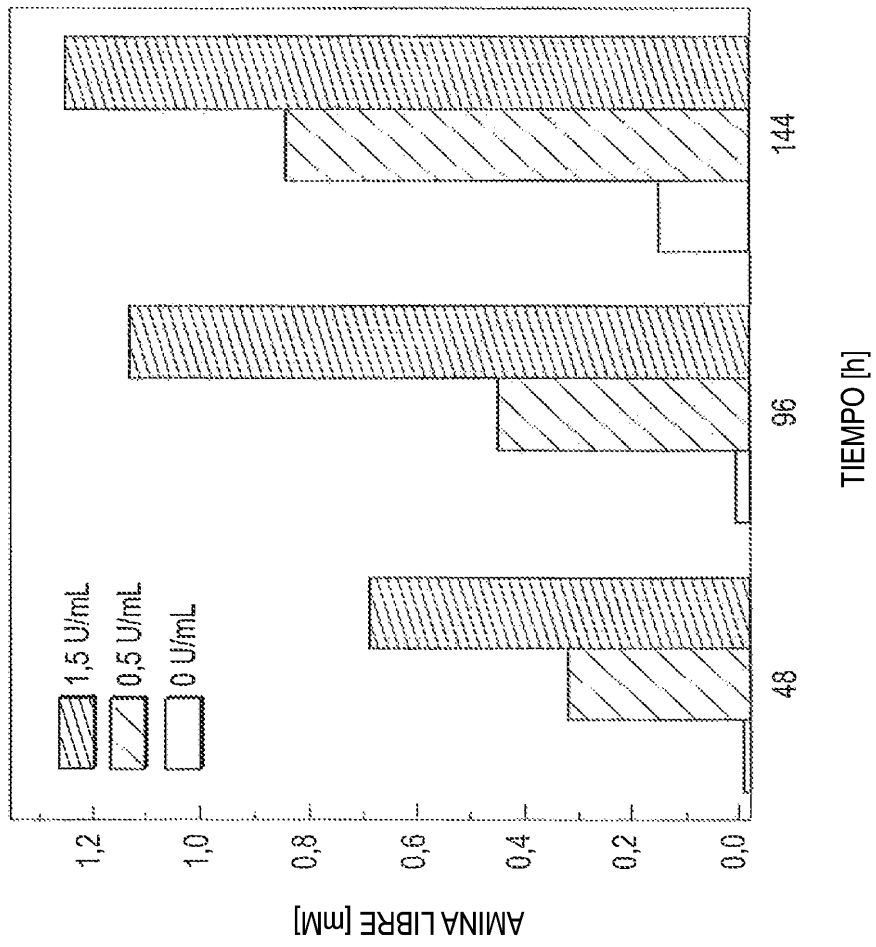


FIG. 8

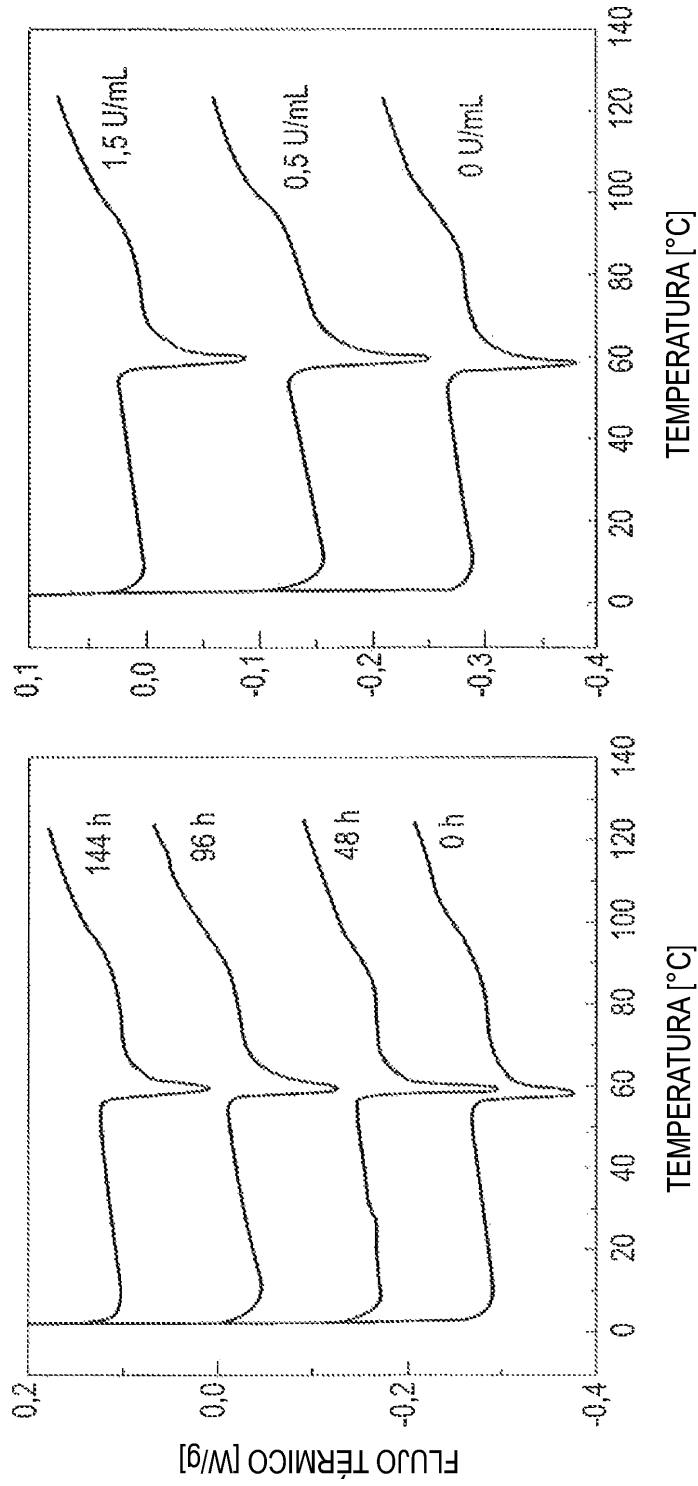


FIG. 9B

FIG. 9A

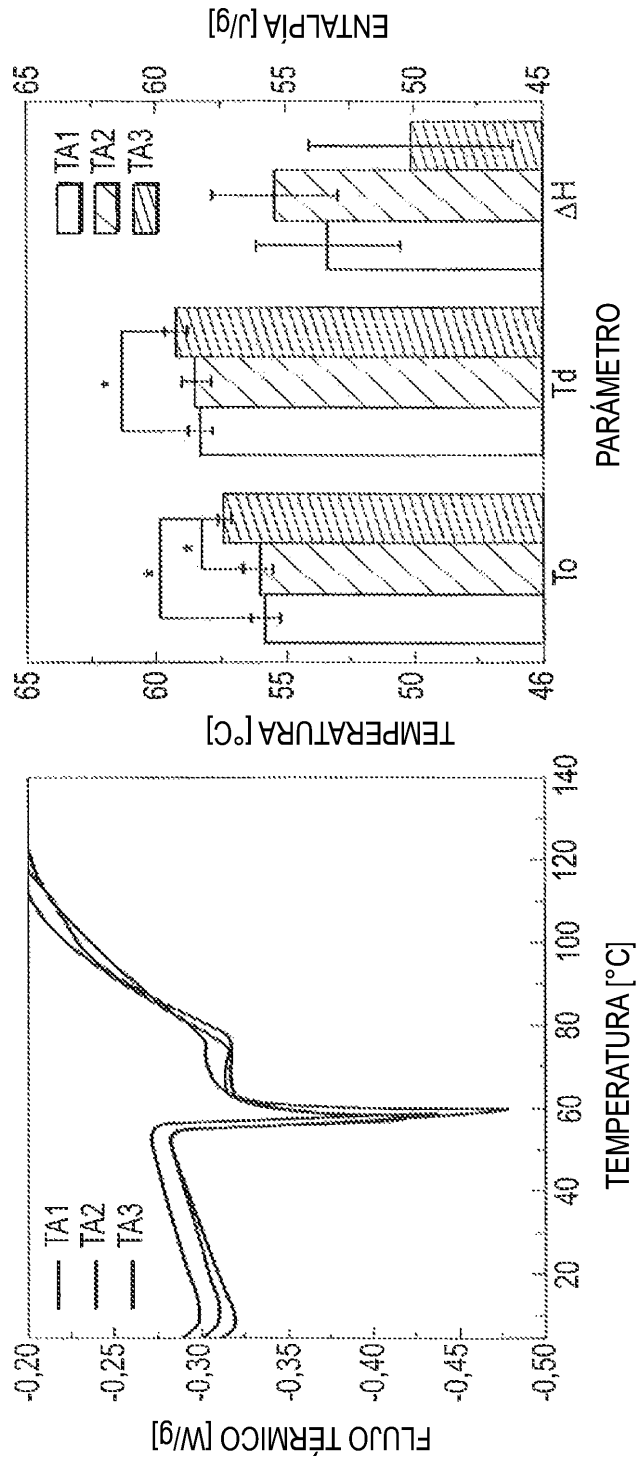


FIG. 10B

FIG. 10A