

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 720 137**

51 Int. Cl.:

A61L 27/24 (2006.01)

A61L 27/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.04.2012 PCT/US2012/035361**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.11.2012 WO12149253**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2012 E 12720056 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2019 EP 2701755**

54 Título: **Método para el tratamiento enzimático de productos tisular**

30 Prioridad:
28.04.2011 US 201161479937 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.07.2019

73 Titular/es:
**LIFECCELL CORPORATION (100.0%)
5 Giralda Farms
Madison, New Jersey 07940, US**

72 Inventor/es:
CHEN, YI

74 Agente/Representante:
ISERN JARA, Jorge

ES 2 720 137 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para el tratamiento enzimático de productos tisular

5 La presente divulgación se refiere a matrices de tejidos, y más particularmente, a métodos para controlar la flexibilidad de las matrices tisulares tratando las matrices con enzimas proteolíticas.

Se utilizan diversos productos derivados de tejidos para regenerar, reparar o tratar de otra manera tejidos y órganos enfermos o dañados. Dichos productos pueden incluir injertos de tejido intacto y/o tejidos acelulares o acelulares reconstituidos (por ejemplo, matrices de tejido acelular de piel, intestino u otros tejidos, con o sin siembra de células). Dichos productos generalmente tienen propiedades mecánicas determinadas por el origen tisular (es decir, el tipo de tejido y el animal del que proceden) y los parámetros de procesamiento utilizados para producir los productos de tejido. Dado que los productos de tejido se usan a menudo para aplicaciones quirúrgicas y/o reemplazo o aumento de tejido, las propiedades mecánicas de los productos de tejido son importantes. Por ejemplo, los cirujanos generalmente prefieren los tejidos que se sienten más naturales y/o que son fáciles de manejar durante los procedimientos quirúrgicos. Sin embargo, algunos productos de tejido son indeseablemente rígidos y tienen una sensación poco natural. Por consiguiente, se proporcionan métodos para tratar los productos de tejido para producir propiedades mecánicas más deseables.

20 <Ionescu *et al.*, Annals of University Dunarea de Jos of Galati, pág. 9-16, enero de 2008, divulgan un método para ablandar la carne de res.>

RESUMEN

25 La invención se define en las reivindicaciones.

De acuerdo con ciertas formas de realización, se proporciona un método para tratar una matriz tisular. El método puede comprender seleccionar una matriz tisular que contiene colágeno y poner en contacto la matriz tisular con una enzima proteolítica en condiciones suficientes para producir un nivel deseado de flexibilidad en la matriz tisular.

30 En otra forma de realización, se proporciona un método para tratar una matriz tisular. El método puede comprender seleccionar una matriz de tejido acelular que contiene colágeno y poner en contacto la matriz tisular con una enzima proteolítica en condiciones suficientes para producir un nivel deseado de flexibilidad en la matriz tisular y para aumentar la porosidad de la matriz tisular.

35 Se divulga una matriz de tejido acelular. La matriz puede prepararse mediante un procesamiento que comprende seleccionar una matriz de tejido acelular y poner en contacto la matriz tisular con una enzima proteolítica en condiciones suficientes para producir un nivel deseado de flexibilidad en la matriz tisular.

40 DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1A-Figura 1D muestran matrices de tejido acelular después del tratamiento con enzimas utilizando los métodos de la presente divulgación, así como controles sin tratar.

45 La Figura 2 es un diagrama de cajas de datos de pruebas de resistencia a la tracción para muestras tratadas y de control.

La Figura 3 es un diagrama de cajas de datos de pruebas de resistencia a la sutura para muestras tratadas y de control.

La Figura 4 es un diagrama de cajas de datos de pruebas de resistencia al desgarro para muestras tratadas y de control.

50 La Figura 5 es un diagrama de cajas de datos de pruebas de digestión de colagenasa para muestras tratadas y de control.

La Figura 6 es un diagrama de caja de datos de pruebas de resistencia a la fluencia para muestras tratadas y de control.

55 DESCRIPCIÓN DE CIERTAS FORMAS DE REALIZACIÓN EJEMPLARES

Ahora se hará referencia en detalle a ciertas formas de realización ejemplares de acuerdo con la presente divulgación, cuyos determinados ejemplos se ilustran en los dibujos adjuntos. Siempre que sea posible, se utilizarán los mismos números de referencia en todos los dibujos para referirse a partes iguales o similares.

60 En esta solicitud, el uso del singular incluye el plural a menos que se indique específicamente otra cosa. En esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario. Además, el uso del término "que incluye", así como otras formas, tales como "incluye" e "incluido", no es limitante. Se entenderá que cualquier intervalo descrito en el presente documento incluye los extremos y todos los valores entre los extremos.

65

Los encabezados de sección usados en el presente documento son solo para fines organizativos y no deben interpretarse como limitantes de la materia objeto descrita.

5 Como se usa en el presente documento, "producto de tejido" se referirá a cualquier tejido humano o animal que contenga proteínas de matriz extracelular. Los "productos de tejido" pueden incluir matrices de tejido acelular o parcialmente descelularizadas, matrices de tejido descelularizado que se han repoblado con células exógenas y/o tejidos celulares que se han procesado para cambiar la orientación de al menos algunas de las fibras de colágeno dentro de la matriz extracelular del tejido.

10 Se pueden usar diversos tejidos humanos y animales para producir productos para el tratamiento de pacientes. Por ejemplo, se han producido diversos productos de tejido para la regeneración, reparación, aumento, refuerzo y/o tratamiento de tejidos humanos que se han dañado o perdido debido a diversas enfermedades y/o daños estructurales (por ejemplo, traumatismo, cirugía, atrofia y/o desgaste a largo plazo y degeneración). Dichos productos pueden incluir, por ejemplo, matrices de tejido acelular, aloinjertos de tejido o xenoinjertos y/o tejidos
15 reconstituidos (es decir, tejidos al menos parcialmente descelularizados que se han sembrado con células para producir materiales viables).

Para aplicaciones quirúrgicas, a menudo es deseable producir productos de tejido que tengan ciertas propiedades mecánicas. Por ejemplo, el producto de tejido, que puede incluir una lámina de material, debe poseer suficiente
20 resistencia para soportar el uso previsto. Por ejemplo, ciertos productos de tejido se pueden usar para reparar defectos (por ejemplo, hernias), para soportar los tejidos circundantes o implantes (por ejemplo, para el aumento y/o reconstrucción de mamas), o para reemplazar tejido dañado o perdido (por ejemplo, después de un traumatismo o cirugía de resección). Cualquiera que sea el uso particular, el producto de tejido debe tener suficiente resistencia, elasticidad y/u otras propiedades mecánicas para funcionar hasta que se produzca la regeneración y/o reparación
25 del tejido.

Además, los productos de tejido deben tener una sensación deseable. Por ejemplo, los cirujanos generalmente prefieren los materiales que tienen una sensación similar a un tejido natural (por ejemplo, son lo suficientemente
30 suaves, flexibles y/o elásticos). Además, después de la implantación, es deseable que los productos de tejido se sientan más naturales. Por ejemplo, los tejidos utilizados para el aumento de senos no deben ser excesivamente rígidos para producir una sensación de seno más natural.

Sin embargo, algunos productos de tejido pueden ser excesivamente rígidos. Por ejemplo, algunos cirujanos señalan que los materiales dérmicos derivados de cerdo, tal como STRATTICE™, son menos flexibles que los
35 productos dérmicos humanos, tal como ALLODERM®. Sin embargo, los procesos para mejorar la sensación de dichos productos no deberían afectar negativamente a las propiedades biológicas y/o mecánicas de los productos. Específicamente, el procesamiento de los productos para mejorar la sensación de los productos no debe producir una disminución no deseada en otras propiedades mecánicas, tal como la resistencia a la tracción, y no debe alterar la matriz proteica de tal manera que el material no apoye la regeneración y/o reparación del tejido.

40 La presente descripción proporciona métodos para tratar tejidos para mejorar la sensación de los productos de tejido producidos a partir de los tejidos. La divulgación también proporciona productos de tejido producidos utilizando los métodos de tratamiento. Además, la presente divulgación proporciona métodos de tratamiento de tejidos para controlar la porosidad de productos de tejido producidos a partir de los tejidos. En algunos casos, el control de la
45 porosidad puede mejorar la infiltración celular y la regeneración y/o reparación de tejidos.

Por consiguiente, en una forma de realización, se proporciona un método para tratar una matriz tisular. El método puede comprender seleccionar una matriz tisular que contiene colágeno y poner en contacto la matriz tisular con una
50 enzima proteolítica en condiciones suficientes para producir un nivel deseado de flexibilidad en la matriz tisular. En otra forma de realización, se proporciona un método para tratar una matriz tisular. El método puede comprender seleccionar una matriz de tejido acelular que contiene colágeno y poner en contacto la matriz tisular con una enzima proteolítica en condiciones suficientes para producir un nivel deseado de flexibilidad en la matriz tisular y para aumentar la porosidad de la matriz tisular. La Figura 1A-Figura 1D muestran matrices de tejido acelular (STRATTICE™) después del tratamiento con enzimas utilizando los métodos de la presente divulgación, así como
55 controles sin tratar. Como se muestra, las muestras tratadas son significativamente más flexibles.

En diversas formas de realización, el tratamiento de matrices tisulares con enzimas proteolíticas proporciona propiedades mecánicas mejoradas sin causar degradación en una o más propiedades biológicas. Por ejemplo, el
60 tratamiento de las matrices tisulares puede producir las propiedades deseadas de rigidez, sensación, y táctiles y/o la porosidad deseada, sin aumentar la inflamación o la formación de cicatrices y/o sin causar una reducción en la capacidad de las matrices tisulares para promover el crecimiento y la regeneración de las células.

Los tejidos se pueden seleccionar para proporcionar una diversidad de propiedades biológicas y mecánicas diferentes. Por ejemplo, se puede seleccionar una matriz de tejido acelular u otro producto de tejido para permitir el
65 crecimiento y remodelación de los tejidos para facilitar la regeneración del tejido que normalmente se encuentra en el sitio donde se implanta la matriz. Por ejemplo, una matriz de tejido acelular, cuando se implanta sobre o en la

fascia, puede seleccionarse para permitir la regeneración de la fascia sin fibrosis excesiva o la formación de cicatriz. En ciertas formas de realización, el producto de tejido puede formarse a partir de ALLODERM® o STRATTICE™, que son matrices dérmicas acelulares humanas y porcinas, respectivamente. Como alternativa, se pueden usar otras matrices de tejido acelular adecuadas, como se describe a continuación. Los tejidos pueden seleccionarse de una diversidad de fuentes de tejido incluyendo piel (dermis o toda la piel), fascia, tejido pericárdico, duramadre, tejido del cordón umbilical, tejido placentario, tejido valvular cardiaco, tejido ligamentoso, tejido del tendón, tejido arterial, tejido venoso, tejido conectivo neural, tejido de la vejiga urinaria, tejido de uréter y tejido intestinal. Los métodos descritos en el presente documento se pueden usar para procesar cualquier tipo de tejido colágeno, y para cualquier producto de matriz tisular. Por ejemplo, Badylak *et al.* describen una serie de materiales de andamiaje biológicos, y los métodos de la presente divulgación se pueden usar para tratar estos u otros productos de tejido conocidos en la técnica. Badylak *et al.*, "Extracellular Matrix as a Biological Scaffold Material: Structure and Function", Acta Biomaterialia (2008), doi:10.1016/j.actbio.2008.09.013.

En algunos casos, la matriz tisular se puede proporcionar como una matriz tisular descelularizada. Las matrices de tejido acelular adecuadas se describen más adelante. En otros casos, el método puede incluir además el procesamiento de tejido intacto para eliminar células u otros materiales. Los tejidos se pueden descelularizar total o parcialmente para producir matrices de tejido acelular o materiales de tejido extracelular que se utilizarán para los pacientes. Por ejemplo, diversos tejidos, tal como la piel, el intestino, el hueso, el cartílago, el tejido nervioso (por ejemplo, las fibras nerviosas o la duramadre), los tendones, los ligamentos, u otros tejidos se pueden descelularizar total o parcialmente para producir productos de tejido útiles para los pacientes. En algunos casos, estos productos descelularizados pueden usarse sin la adición de materiales celulares exógenos (por ejemplo, células madre). En ciertos casos, estos productos descelularizados pueden sembrarse con células de origen autólogo u otro origen para facilitar el tratamiento. Los procesos adecuados para producir matrices de tejido acelular se describen a continuación.

Se pueden usar varias enzimas diferentes para tratar las matrices tisulares. Por ejemplo, las enzimas adecuadas pueden incluir proteasas de sulfhidrilo tal como bromelaina. Además, pueden incluir bromelina, papaína, ficina, actinidina o combinaciones de las mismas. Las enzimas pueden comprarse comercialmente o extraerse de fuentes frutales. Por ejemplo, una fuente de bromelaina es MCCORMICK MEAT TENDERIZER®, pero las enzimas también se pueden extraer de la piña y/o adquirirse en una formulación de calidad médica.

Las enzimas pueden ponerse en contacto con los tejidos para aumentar la flexibilidad del tejido sin causar una degradación no deseada en otras propiedades mecánicas y/o biológicas. Por ejemplo, cuando se produce un lote de materiales con o sin los tratamientos enzimáticos analizados en el presente documento, los tratamientos enzimáticos no producirán un cambio no deseado en al menos uno de la resistencia a la tracción, resistencia al desgarro, resistencia de la sutura, resistencia a la fluencia, susceptibilidad a la colagenasa, contenido de glucosaminoglicano, contenido de lectina, resistencia al estallido, temperatura de transición térmica, o combinaciones de los mismos. En algunos casos, un cambio no deseable es una reducción estadísticamente significativa de la resistencia a la tracción, la resistencia al desgarro, la resistencia de la sutura, la resistencia a la fluencia, el contenido de glucosaminoglicanos, el contenido de lectina, la resistencia a la rotura; un aumento en la susceptibilidad a la colagenasa; o un cambio (ascendente o descendente) en la temperatura de transición térmica (de acuerdo como se mide utilizando calorimetría diferencial de barrido).

Como se señala anteriormente, en algunas formas de realización, los tejidos se tratan con una enzima para aumentar la porosidad del tejido. En diversas formas de realización, el aumento de la porosidad del tejido se realiza para aumentar el número y/o el tamaño de los canales, lo que puede mejorar la velocidad de infiltración celular y la regeneración tisular.

En algunos casos, las enzimas se seleccionan de tal manera que causen la escisión de sitio específico de proteínas dentro de los tejidos. Por ejemplo, se ha encontrado que el tratamiento de materiales dérmicos porcinos con bromelina no causa alteraciones adicionales en la estructura de la matriz después de una cierta cantidad de tratamiento. Por lo tanto, el tratamiento de la dermis con bromelina no causa un cambio adicional en la matriz con la exposición prolongada o después de largos periodos de tiempo.

Además, la enzima se puede aplicar a los tejidos en una diversidad de soluciones adecuadas. Por ejemplo, se ha encontrado que la bromelina es eficaz cuando se aplica a tejidos en solución salina normal, pero se pueden usar otros tampones adecuados (por ejemplo, PBS).

Matrices de tejido acelular

El término "matriz de tejido acelular", como se usa en el presente documento, se refiere generalmente a cualquier matriz tisular que está sustancialmente libre de células y/o componentes celulares. Pueden utilizarse la piel, partes de la piel (por ejemplo, la dermis), y otros tejidos, tales como los vasos sanguíneos, las válvulas cardíacas, la fascia y el tejido conjuntivo nervioso, para crear matrices acelulares dentro del alcance de la presente divulgación. Las matrices de tejido acelular se pueden ensayar o evaluar para determinar si están sustancialmente libres de componentes celulares y/o celulares de varias maneras. Por ejemplo, los tejidos procesados pueden inspeccionarse

con microscopía óptica para determinar si quedan células (vivas o muertas) y/o componentes celulares. Además, pueden usarse ciertos ensayos para identificar la presencia de células o componentes celulares. Por ejemplo, se pueden usar ensayos de ADN u otros ácidos nucleicos para cuantificar los materiales nucleares restantes dentro de las matrices de tejido. Generalmente, la ausencia de ADN restante u otros ácidos nucleicos será indicativa de una descelularización completa (es decir, la eliminación de células y/o componentes celulares). Finalmente, se pueden usar otros ensayos que identifican componentes específicos de células (por ejemplo, antígenos de superficie) para determinar si las matrices tisulares son acelulares. Pueden utilizarse la piel, partes de la piel (por ejemplo, la dermis), y otros tejidos, tales como los vasos sanguíneos, las válvulas cardíacas, la fascia y el tejido conjuntivo nervioso, para crear matrices acelulares dentro del alcance de la presente divulgación.

En general, las etapas implicadas en la producción de una matriz de tejido acelular incluyen extraer el tejido de un donante (por ejemplo, un cadáver humano o una fuente animal) y la eliminación de células en condiciones que conservan la función biológica y estructural. En ciertas formas de realización, el proceso incluye tratamiento químico para estabilizar el tejido y evitar la degradación bioquímica y estructural junto con o antes de la eliminación de células. En diversas formas de realización, la solución estabilizante inicial detiene e impide la degradación osmótica, hipóxica, autolítica y proteolítica, protege frente a la contaminación microbiana, y reduce el daño mecánico que se puede producir con tejidos que contengan, por ejemplo, componentes de músculo liso (por ejemplo, vasos sanguíneos). La solución estabilizante puede contener un tampón apropiado, uno o más antioxidantes, uno o más agentes oncóticos, uno o más antibióticos, uno o más inhibidores de proteasas, y/o uno o más relajantes del músculo liso.

Después, el tejido se coloca en una solución de descelularización para eliminar las células viables (por ejemplo, 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 apropiado, sal, un antibiótico, uno o más detergentes (por ejemplo, TRITON X-100™, desoxicolato de sodio, monooleato de polioxietileno (20) sorbitán), uno o más agentes para impedir el entrecruzamiento, uno o más inhibidores de proteasas, y/o una o más enzimas. En algunas formas de realización, la solución de descelularización comprende TRITON X-100™ al 1% en medios RPMI con gentamicina y EDTA 25 mM (ácido etilendiaminetetraacético). En algunas formas de realización, el tejido se incuba en la solución de descelularización durante la noche a 37°C con agitación suave a 90 rpm. En ciertas formas de realización, se pueden usar detergentes adicionales para eliminar la grasa de la muestra tisular. Por ejemplo, en algunas formas de realización, se añade desoxicolato de sodio al 2% a la solución de descelularización.

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

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

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

Dado que los mamíferos no primates (por ejemplo, cerdos) producen epítomos α -gal, el xenotrasplante de material que contiene colágeno de estos mamíferos en primates a menudo da como resultado el rechazo debido a la unión de primate anti-Gal a estos epítomos en el material que contiene colágeno. La unión da como resultado la destrucción del material que contiene colágeno por la fijación del complemento y por la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. U. Galili *et al.*, Immunology Today 14: 480 (1993); M. Sandrin *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 11391 (1993); H. Good *et al.*, Transplant. Proc. 24: 559 (1992); B. H. Collins *et al.*, J. Immunol. 154: 5500 (1995). Además, el xenotrasplante da como resultado una activación importante del sistema inmunitario para producir mayores cantidades de anticuerpos anti-gal de alta afinidad. Por consiguiente, en algunas formas de

realización, cuando los animales que producen epítomos α -gal se utilizan como fuente de tejido, la eliminación sustancial de epítomos α -gal de las células y de los componentes extracelulares del material que contiene colágeno, y la prevención de la reexpresión de los epítomos α -gal celulares pueden disminuir la respuesta inmune contra el material que contiene colágeno asociado con la unión del anticuerpo anti-gal a los epítomos α -gal.

Para eliminar los epítomos α -gal, después de lavar el tejido a fondo con una solución salina para eliminar la solución de DNasa, la muestra de tejido se puede someter a uno o más tratamientos enzimáticos para eliminar ciertos antígenos inmunogénicos, si están presentes en la muestra. En algunas formas de realización, la muestra de tejido puede tratarse con una enzima α -galactosidasa para eliminar los epítomos α -gal si están presentes en el tejido. En algunas formas de realización, la muestra de tejido se trata con α -galactosidasa a una concentración de 300 U/l preparada en tampón fosfato 100 mM a pH 6,0. En otras formas de realización, la concentración de α -galactosidasa se aumenta a 400 U/l para la eliminación adecuada de los epítomos α -gal del tejido recogido. Se puede usar cualquier concentración de enzima y tampón adecuados siempre que se logre la eliminación suficiente de antígenos.

Como alternativa, en lugar de tratar el tejido con enzimas, los animales que han sido modificados genéticamente para que carezcan de uno o más epítomos antigénicos pueden seleccionarse como la fuente de tejido. Por ejemplo, los animales (por ejemplo, cerdos) que han sido modificados genéticamente para que carezcan del resto α -galactosa terminal pueden seleccionarse como la fuente de tejido. Para las descripciones de los animales apropiados, véanse la Solicitud de Estados Unidos N.º de Serie 10/896.594 y la Patente de Estados Unidos N.º 6.166.288 pendientes junto con la presente. Además, ciertos métodos ejemplares de procesamiento de tejidos para producir matrices acelulares con o sin cantidades reducidas o que carecen de restos de alfa-1,3-galactosa, se describen en Xu, Hui. *et al.*, "A Porcine-Derived Acellular Dermal Scaffold that Supports Soft Tissue Regeneration: Removal of Terminal Galactose- α (1,3)-Galactose and Retention of Matrix Structure", *Tissue Engineering*, Vol. 15, 1-13 (2009).

Después de formarse la matriz de tejido acelular, se pueden sembrar opcionalmente células viables histocompatibles en la matriz de tejido acelular para producir un injerto que puede remodelarse adicionalmente por el huésped. En algunas formas de realización, las células viables e histocompatibles se pueden añadir a las matrices mediante técnicas estándar de cocultivo celular *in vitro* antes del trasplante, o mediante repoblación *in vivo* después del trasplante. La repoblación *in vivo* puede ser por las propias células del receptor que migran a la matriz de tejido acelular o por la infusión o inyección de células obtenidas del receptor o células histocompatibles de otro donante en la matriz de tejido acelular *in situ*. Se pueden usar diversos tipos de células, incluidas células madre embrionarias, células madre adultas (por ejemplo, células madre mesenquimales) y/o células neuronales. En diversas formas de realización, las células pueden aplicarse directamente a la porción interna de la matriz de tejido acelular justo antes o después de la implantación. En ciertas formas de realización, las células pueden colocarse dentro de la matriz de tejido acelular para ser implantadas, y cultivarse antes de la implantación.

Ejemplo

El siguiente ejemplo ilustra un proceso para tratar matrices de tejido acelular dérmico porcino con bromelina para aumentar la flexibilidad del material. Como se analiza a continuación, el tratamiento no causó un cambio no deseable en diversas propiedades mecánicas. Además, el tratamiento aumenta la porosidad del material, lo que puede mejorar la velocidad de infiltración celular y la regeneración tisular.

Para este experimento, se usaron matrices de tejido acelular STRATTICE™, de acuerdo como se obtuvieron de LIFECCELL CORPORATION (Branchburg, NJ). STRATTICE™ está disponible en una forma flexible y una versión más firme, dependiendo de la ubicación anatómica de la que se obtuvo el material. Se utilizaron ambos tipos para este experimento. Las muestras utilizadas para las pruebas se cortaron en cuartos, y se trataron tres cuartos. Se usaron muestras no tratadas (1 cuarto) como controles; los controles se refrigeraron durante el tratamiento. STRATTICE™ se empaqueta en una solución y, por lo tanto, no requiere rehidratación. Las muestras tratadas se colocaron en 0,5 litros de agua fría del grifo que contenía 55 g de MCCORMICK MEAT TENDERIZER.

La Figura 1A-Figura 1D muestran matrices de tejido acelular después del tratamiento con enzimas utilizando los métodos de la presente divulgación, así como controles sin tratar. Las Figuras 2-6 son diagramas de cajas de resistencias a la tracción, resistencias a la sutura, resistencias al desgarrar, degradación de la elastasa y resistencia a la fluencia para cada muestra tratada y de control. Las muestras tratadas tuvieron una flexibilidad notablemente mayor en comparación con los controles, pero no tuvieron una reducción significativa en otras propiedades mecánicas. Además, no se encontraron cambios significativos en la temperatura de transición térmica ni en la susceptibilidad a la colagenasa. La prueba T emparejada en general no mostró diferencias estadísticas entre los grupos de control y de tratamiento.

REIVINDICACIONES

1. Un método para tratar una matriz tisular, que comprende:
5 seleccionar una matriz de tejido que contiene colágeno;
 eliminar todas las células y componentes celulares de la matriz tisular; y
 poner en contacto la matriz tisular con una enzima proteolítica en condiciones suficientes para producir un
 aumento en la flexibilidad de la matriz tisular.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que la matriz tisular comprende una matriz de tejido dérmico.
- 15 3. El método de la reivindicación 1, en el que el tejido se selecciona de fascia, tejido pericárdico, duramadre, tejido
 del cordón umbilical, tejido placentario, tejido valvular cardíaco, tejido ligamentoso, tejido del tendón, tejido
 arterial, tejido venoso, tejido conectivo neural, tejido de la vejiga urinaria, tejido de uréter y tejido intestinal.
- 20 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la enzima se selecciona de bromelina,
 papaína, ficina, actinidina o combinaciones de las mismas.
- 25 5. El método de la reivindicación 4, en el que la enzima es bromelina.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la matriz tisular se pone en contacto con la
 enzima proteolítica en condiciones que aumentan la porosidad de la matriz tisular.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la matriz de tejido se pone en contacto con la
 enzima proteolítica en condiciones que no causan una reducción estadísticamente significativa en la resistencia a la
 tracción, resistencia al desgarro, resistencia a la sutura, resistencia a la fluencia, temperatura de transición térmica, o
 combinaciones de las mismas.

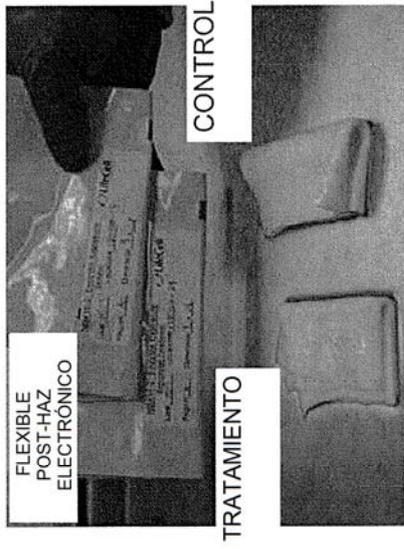


FIG. 1C

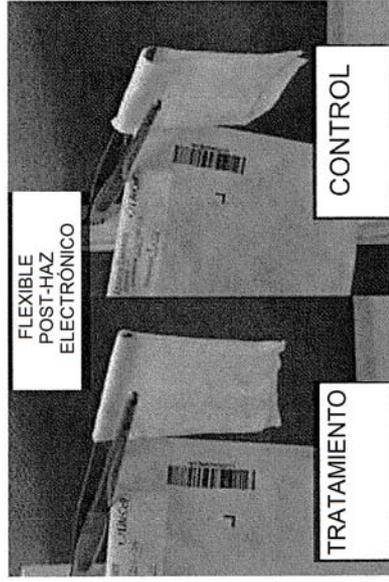


FIG. 1D

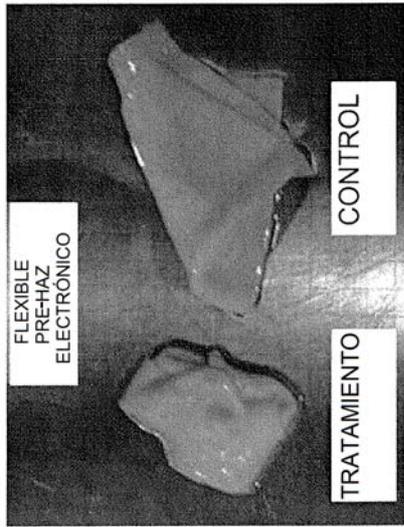


FIG. 1A

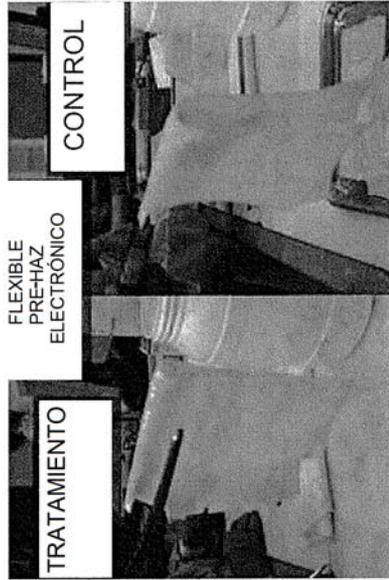


FIG. 1B

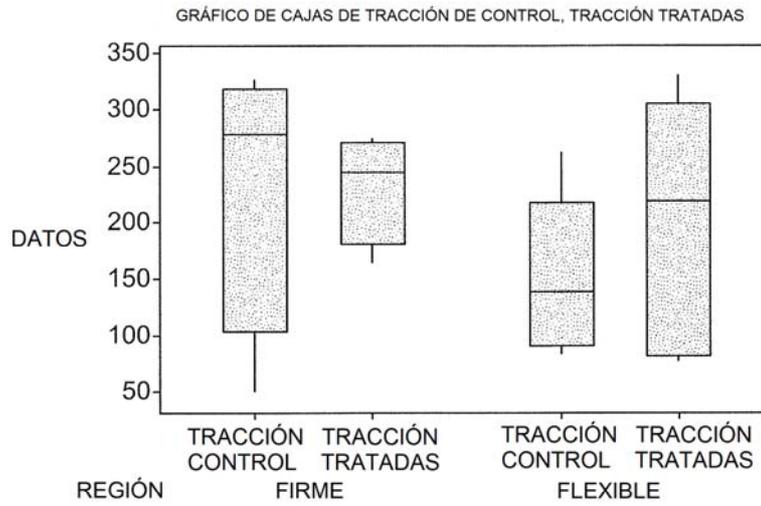


FIG. 2

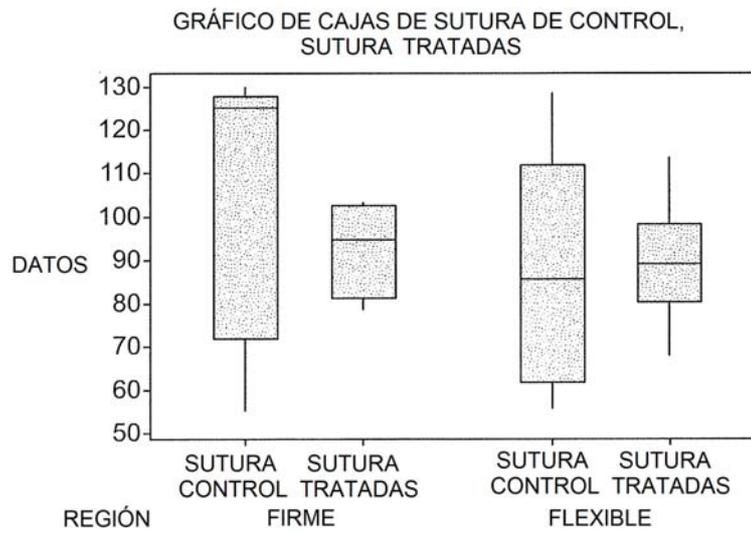


FIG. 3

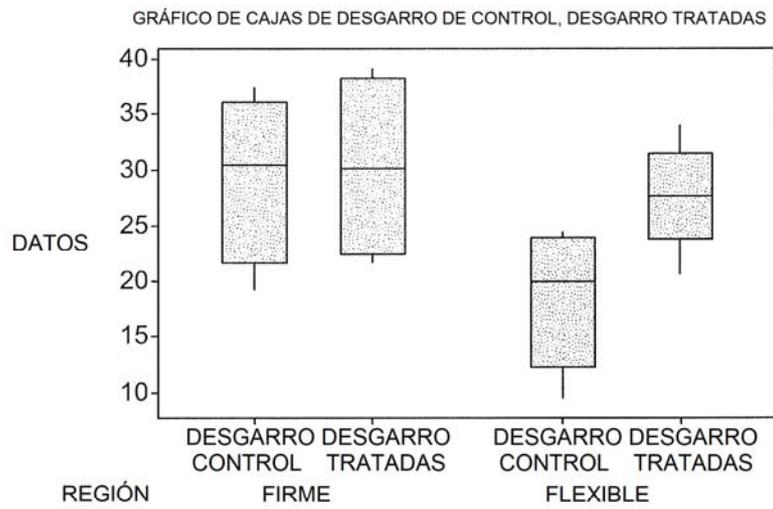


FIG. 4

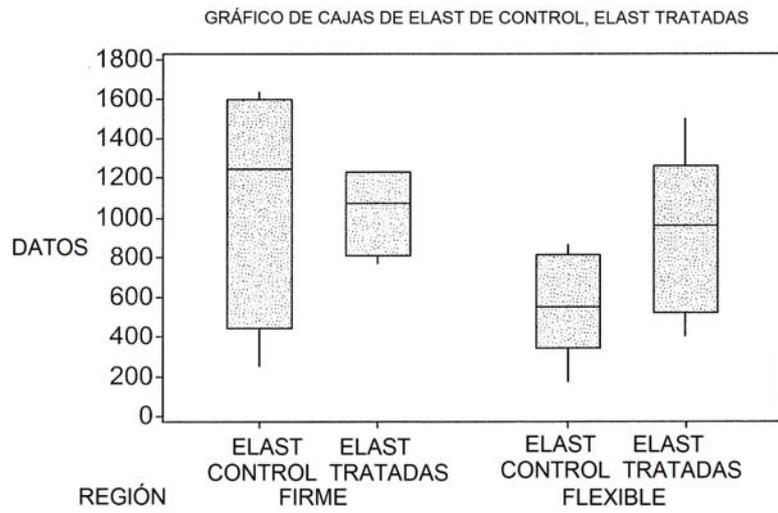


FIG. 5

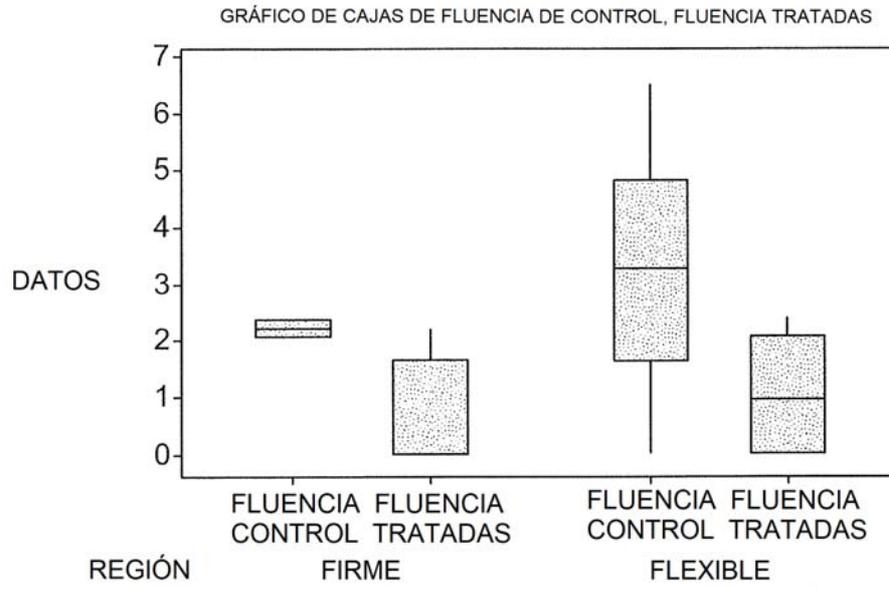


FIG. 6