

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 740 782**

51 Int. Cl.:

A61K 35/12 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.08.2010 E 16176482 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019 EP 3103461**

54 Título: **Método de esterilización de dermis**

30 Prioridad:

18.08.2009 US 234681 P

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

06.02.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

KIBALO, BENJAMIN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 740 782 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 de esterilización de dermis

5 Descripción

Los tejidos humanos y animales se pueden usar para producir una variedad de productos de tejido para uso en paciente. Los tejidos a menudo se procesan para eliminar ciertos componentes celulares y/o no celulares y/o para destruir los patógenos presentes en los tejidos. Además, durante el procesamiento o almacenamiento, los tejidos pueden congelarse y descongelarse.

SUMARIO

De acuerdo con ciertas realizaciones de la divulgación, se proporciona un procedimiento para descelularizar una muestra de tejido, que comprende proporcionar una muestra de tejido que comprende una dermis de mamífero separada de la epidermis circundante en un líquido; y aplicar una presión al líquido de al menos 200 MPa durante un tiempo suficiente para destruir sustancialmente todas las células del tejido nativo dentro del tejido blando, en donde la destrucción de prácticamente todas las células incluye la ruptura de la membrana celular de las células de tal manera que el lavado de la muestra de tejido en una solución salina permite la eliminación de al menos el 95% de las células del tejido nativo.

De acuerdo con ciertas realizaciones de la divulgación, se proporciona un procedimiento para descongelar una muestra de tejido, que comprende proporcionar una muestra de tejido que comprende un tejido de mamífero que está al menos parcialmente congelado en un líquido; y aplicar una presión al líquido suficiente para descongelar la muestra de tejido congelado.

De acuerdo con ciertas realizaciones de la divulgación, se proporciona un procedimiento para descelularizar una muestra de tejido, que comprende proporcionar una muestra de tejido que comprende un tejido de mamífero en un recipiente que contiene líquido; y aplicar una presión al líquido durante un tiempo suficiente para destruir sustancialmente todas las células dentro del tejido blando, en donde la destrucción de prácticamente todas las células incluye la ruptura de la membrana celular de las células de tal manera que el lavado de la muestra de tejido en una solución salina permite la eliminación de al menos el 95% de las células del tejido nativo, y en el que la presión se aplica a una tasa tal que la temperatura de la muestra de tejido no exceda de 30°C.

De acuerdo con ciertas realizaciones de la divulgación, se proporciona un procedimiento para reducir la carga biológica en una muestra de tejido, que comprende proporcionar una muestra de tejido que comprende un tejido blando de mamífero en un recipiente que contiene líquido; y aplicar una presión al líquido durante un tiempo suficiente para causar al menos una reducción logarítmica de 5 en la concentración bacteriana dentro del tejido blando, en el que durante la aplicación de la presión, la temperatura de la muestra de tejido no excede los 30°C. La invención se define en las reivindicaciones.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Fig. 1 es un diagrama de fases para el agua.
 La Fig. 2A son datos de los resultados del ensayo de carga biológica para muestras de piel porcina completa, como se describe en el Experimento 1.
 La Fig. 2B son datos de los resultados del ensayo de carga biológica para dermis porcina, como se describe en el Experimento 1.
 La Fig. 3 son datos de los resultados de ensayo de carga biológica para dermis porcina, como se describe en el Experimento 2.
 La Fig. 4 es la curva de temperatura frente al perfil de presión para las muestras de los Experimentos 1 y 2.

DESCRIPCIÓN DE DETERMINADAS REALIZACIONES EJEMPLO

Ahora se hará referencia en detalle a determinadas realizaciones ejemplo de acuerdo con la presente divulgación, ilustrándose determinados ejemplos de las mismas 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.

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

Tal como se usa en el presente documento, se entiende que "alta presión hidrostática" se refiere a la presión aplicada a un objeto contenido en un líquido, el líquido que se presuriza para ejercer fuerza sobre el objeto. En ciertas realizaciones, la presión hidrostática alta puede incluir presiones aplicadas al líquido que son mayores que 200 MPa.

5 Tal como se usa en el presente documento, "carga biológica" significa la cantidad de microorganismos en una muestra de tejido, que incluye, pero sin limitarse a, bacterias, virus, hongos, parásitos, clamidias, rickettsias, micoplasmas y protozoos.

10 Tal como se usa en el presente documento, "productos de tejido" o "productos derivados de tejido" significa cualquier producto producido a partir de un tejido que se ha alterado de alguna manera (por ejemplo, pero sin limitarse a, eliminación de las células del tejido, eliminando ciertos químicos del tejido, o esterilización del tejido). Tal como se usa en el presente documento, "muestras de tejido" incluye tanto tejidos intactos, sin procesar, como tejidos que se han procesado para producir "productos de tejido" o "productos derivados de tejido".

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

20 Se pueden utilizar diversos tejidos humanos y animales para producir productos para el tratamiento de pacientes. Por ejemplo, varios productos de tejidos 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 que se han producido (p. ej., por traumatismo, cirugía, atrofia y/o desgaste a largo plazo y la degeneración). Dichos productos pueden incluir, por ejemplo, matrices de tejidos y/o proteínas derivadas de tejidos o materiales que contienen proteínas (por ejemplo, glicosaminoglicanos) que se pueden usar solos o en combinación con otros materiales y/o productos químicos.

25 En ciertas realizaciones, estos productos se pueden descelularizar total o parcialmente para producir matrices de tejido o materiales de tejido extracelular para usar en pacientes. Por ejemplo, varios tejidos, tales como la piel, el intestino, el hueso, el cartílago, el tejido nervioso (p. ej., las fibras nerviosas o la duramadre), los tendones, los ligamentos u otros tejidos pueden descelularizarse 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 fuentes autólogas u otras para facilitar el tratamiento.

30 Dado que los productos de tejido a menudo se implantan en o dentro del cuerpo de un paciente, en ciertas realizaciones, es deseable esterilizar tales materiales, o al menos reducir la cantidad de bacterias u otros patógenos que podrían estar en los productos, a un nivel aceptable para el producto seleccionado. En ciertas realizaciones, varios tejidos, productos derivados de tejidos y otros dispositivos médicos implantables típicamente se esterilizan utilizando procesos como la irradiación (por ejemplo, gamma, haz de electrones o rayos X), tratamiento con productos químicos o calor.

35 Para su uso en diversas aplicaciones médicas o quirúrgicas, los tejidos o productos tisulares deben poseer las propiedades biológicas deseadas, dependiendo del uso previsto. Por ejemplo, los productos tisulares utilizados para la regeneración de tejidos deben ser generalmente capaces de soportar o inducir el crecimiento y/o regeneración celular. Sin embargo, ciertas técnicas de procesamiento de tejidos pueden dañar algunos tejidos y/o eliminar partes del tejido que pueden ser deseables para ciertas funciones biológicas. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los procesos de descelularización de tejidos pueden incluir el uso de varias enzimas, detergentes y/o productos químicos que pueden dañar o eliminar varias moléculas de señal celular o proteínas de la matriz extracelular deseadas para la regeneración o el crecimiento de ciertos tejidos. Además, en ciertas realizaciones, las técnicas de esterilización, como la irradiación gamma, pueden alterar los productos tisulares al causar la descomposición y/o la alteración química de dichos productos.

40 La presente descripción proporciona procedimientos para procesar muestras de tejidos que mantienen ciertas propiedades biológicas deseadas de los productos de tejidos producidos utilizando dichos procedimientos. En algunas realizaciones de la divulgación, los procedimientos comprenden un procedimiento para descelularizar una muestra de tejido. En ciertas realizaciones de la divulgación, los procedimientos comprenden un procedimiento para descongelar una muestra de tejido. En algunas realizaciones de la divulgación, los procedimientos comprenden un procedimiento para reducir la carga biológica de una muestra de tejido.

45 En algunas realizaciones, los procedimientos para procesar muestras de tejido pueden incluir la aplicación de una alta presión hidrostática a un tejido. En ciertas realizaciones, se puede aplicar una alta presión hidrostática a una muestra de tejido colocando una muestra de tejido en un líquido o proporcionando un tejido en un líquido. En ciertas realizaciones, se puede aplicar presión al líquido, controlando así la presión aplicada a la muestra de tejido. En diversas realizaciones, la presión aplicada a la muestra de tejido, el tiempo que se aplica la presión y/o la tasa de aumento y/o disminución de la presión puede controlarse para descelularizar la muestra de tejido, reducir la carga biológica en la muestra de tejido, y/o descongelar la muestra de tejido.

50

En diversas realizaciones, la presión aplicada a la muestra de tejido puede seleccionarse basándose en una variedad de factores. En algunas realizaciones, la presión se selecciona en función del tipo de muestra de tejido a procesar. En algunas realizaciones, la presión se selecciona para permitir la descelularización de la muestra de tejido mientras se mantienen ciertas propiedades biológicas deseadas de la muestra de tejido. En algunas realizaciones, la presión se selecciona para permitir que el tejido se descongele sin elevar la muestra de tejido por encima de una temperatura seleccionada y/o para permitir la descongelación dentro de un tiempo seleccionado.

En diversas realizaciones, los procedimientos de la presente divulgación se pueden usar para procesar una variedad de diferentes tipos de muestras de tejido. Las muestras de tejidos de mamíferos ejemplo incluyen, pero no se limitan a, hueso, piel, intestino, vejiga urinaria, tendón, ligamento, músculo, fascia, tejido neurológico, hígado, corazón, pulmón, riñón, cartilago y/u otro tejido de mamífero. En ciertas realizaciones, la muestra de tejido puede incluir una muestra de tejido blando de mamífero. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la muestra de tejido puede incluir dermis de mamíferos. En realizaciones de la invención, la dermis se puede separar de la epidermis circundante y/u otros tejidos, tales como grasa subcutánea. En ciertas realizaciones, la muestra de tejido puede incluir submucosa de intestino delgado. En ciertas realizaciones, las muestras de tejido pueden incluir fuentes humanas o no humanas. Ejemplos de fuentes de tejido no humanas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, cerdos, ovejas, cabras, conejos, monos y/u otros mamíferos no humanos.

Se pueden usar varios tipos de sistemas de aplicación de alta presión hidrostática para procesar muestras de tejido de acuerdo con ciertas realizaciones. En ciertas realizaciones, un sistema de aplicación de alta presión hidrostática incluirá un recipiente rígido o contenedor formado por acero u otro material duro. En ciertas realizaciones, una muestra de tejido a tratar se coloca en el recipiente junto con un fluido (por ejemplo, agua). En ciertas realizaciones, la muestra de tejido puede envasarse en un contenedor flexible que también contiene fluido, y el paquete flexible puede colocarse en un recipiente que contiene fluido. En ciertas realizaciones, después de que el recipiente se cargue con la muestra de tejido y el fluido, se aplica presión al fluido en el recipiente. En ciertas realizaciones, la presión puede aplicarse de varias maneras. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la presión puede aplicarse usando un pistón neumático para comprimir el fluido en el recipiente, o una bomba puede forzar el fluido adicional en el recipiente hasta que la presión en el recipiente alcance un nivel deseado.

En ciertas realizaciones, una muestra de tejido se empaqueta en un contenedor flexible que contiene un líquido, y se aplica presión al recipiente. En algunas realizaciones, una muestra de tejido se coloca en un contenedor de presurización rígido que contiene un líquido y se aplica presión al líquido en el contenedor rígido. En algunas realizaciones, la muestra de tejido se empaqueta en un contenedor flexible que contiene un líquido, y el contenedor flexible se coloca en un contenedor de presurización rígido que contiene un líquido, y se aplica presión al líquido en el contenedor rígido. En diversas realizaciones, la presión se puede aplicar al fluido comprimiendo el fluido utilizando, por ejemplo, un pistón, o bombeando fluido de adición en un contenedor con un volumen fijo. En ciertas realizaciones, cuando la muestra de tejido se empaqueta en un contenedor flexible, generalmente, el contenedor flexible se sella de manera que solo el fluido dentro del contenedor flexible contacta con la muestra de tejido.

Se puede usar una variedad de líquidos para entrar en contacto con el líquido durante la aplicación de alta presión hidrostática. Por ejemplo, se pueden usar varias soluciones acuosas. En ciertas realizaciones, el líquido puede incluir una sal acuosa. En ciertas realizaciones, el líquido puede incluir una solución salina, tal como una solución salina tamponada con fosfato.

En algunas realizaciones de la divulgación, la muestra de tejido puede procesarse para destruir algunas o sustancialmente todas las células de tejido nativas de la muestra de tejido. En ciertas realizaciones, la determinación de que se ha logrado la destrucción de las células de tejido nativo se puede realizar lavando una muestra de tejido que se ha tratado con alta presión hidrostática con un líquido que no dañe las células significativamente (por ejemplo, PBS) y analizando las muestras para determinar la cantidad, en su caso, de las células del tejido nativo que quedan. Por ejemplo, en algunas realizaciones, después del tratamiento con alta presión hidrostática para destruir las células, el simple lavado con una solución salina puede eliminar los restos de células, y la muestra lavada puede evaluarse para determinar si las células se han eliminado, lo que indica la destrucción de las células. Ciertos procedimientos adecuados para evaluar las muestras para determinar si las células han sido destruidas y eliminadas son bien conocidos, e incluyen, por ejemplo, microscopía óptica de células de tejido congeladas o fijas. En ciertas realizaciones, la presencia de células o restos de células puede evaluarse utilizando reactivos que indican que el ADN está presente, por ejemplo, se pueden usar kits de cuantificación de PICOGREEN® DNA.

Como se usa en el presente documento, se entenderá que la destrucción de prácticamente todas las células significa que al menos del 95% al 100%, incluidos los puntos finales y todos los porcentajes entre esos puntos finales, de las células de tejido nativo de una muestra de tejido que se ha tratado con la alta presión hidrostática y el lavado en una solución salina no están presentes cuando se evalúa utilizando histología convencional (por ejemplo, microscopía óptica).

En algunas realizaciones de la presente divulgación, las muestras de tejido pueden tratarse con una alta presión hidrostática para eliminar algunas o sustancialmente todas las células en la muestra de tejido, y la muestra de tejido puede tratarse adicionalmente con otros procesos para eliminar las células restantes. Por ejemplo, como se señaló

anteriormente, en diversas realizaciones, se usan varias enzimas, detergentes y/u otros productos químicos para eliminar las células de los tejidos, pero tales tratamientos pueden alterar las matrices extracelulares del tejido. Por lo tanto, para reducir la cantidad de tratamiento con enzimas, detergentes y/u otros productos químicos, las muestras de tejido se pueden tratar primero con un tratamiento de alta presión hidrostática, eliminando así algunas o sustancialmente todas las células, y la muestra de tejido se puede tratar luego con al menos un proceso de descelularización adicional para eliminar las células adicionales, si hay algunas presentes en la muestra de tejido. Reactivos y procedimientos adecuados para realizar la descelularización incluyen, pero no se limitan a, los descritos, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos nº 5.336.616, de Livesey et al.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, la muestra de tejido puede procesarse para producir una matriz tisular acelular. En algunas realizaciones, la matriz tisular acelular puede incluir una matriz extracelular. Por ejemplo, en varias realizaciones, la matriz tisular puede incluir una matriz de colágeno derivada de una variedad de diferentes tejidos blandos de mamíferos. En ciertas realizaciones, la matriz tisular puede incluir una o más proteínas y/o moléculas de matriz extracelular adicionales, que incluyen, entre otras, GAG, moléculas de señalización celular u otras sustancias químicas deseadas para realizar varias funciones biológicas, como la unión celular, adherencia, crecimiento, diferenciación, y/o remodelación.

En algunas realizaciones de la divulgación, un procedimiento para descelularizar una muestra de tejido comprende proporcionar una muestra de tejido que comprende un tejido blando de mamífero en un líquido y aplicar una presión al líquido durante un tiempo suficiente para destruir sustancialmente todas las células de tejido nativo dentro del tejido blando. En algunas realizaciones, la presión se aplica a una presión mínima para destruir sustancialmente todas las células de tejido nativo dentro del tejido blando. En diversas realizaciones, la presión es de al menos 200 MPa, al menos 300 MPa, al menos 400 MPa o al menos 500 MPa. En varias realizaciones, la presión está entre 300 MPa y 500 MPa. En diversas realizaciones, la presión se aplica durante un tiempo suficiente para destruir sustancialmente todas las células de tejido nativo dentro del tejido blando. En diversas realizaciones, la presión se aplica durante al menos 30 minutos a al menos 60 minutos. En ciertas realizaciones, la presión aplicada al líquido es de al menos 400 MPa durante al menos 10 minutos. En ciertas realizaciones, la presión aplicada al líquido es de al menos 400 MPa durante al menos 30 minutos. En ciertas realizaciones, la presión aplicada al líquido es de al menos 500 MPa durante al menos 30 minutos. En diversas realizaciones, los procedimientos de descelularización se realizan sin causar un calentamiento excesivo de la muestra de tejido, como se describe a continuación.

En diversas realizaciones de la divulgación, los procedimientos de la presente divulgación permiten la aplicación de alta presión hidrostática a una muestra de tejido sin causar un calentamiento significativo de la muestra de tejido. En diversas realizaciones, el calentamiento de ciertas muestras de tejido puede dañar varias proteínas de la matriz extracelular del tejido, disminuyendo así las funciones biológicas deseadas de las muestras de tejido cuando se usan para reparar, reemplazar o regenerar el tejido. Por lo tanto, ciertas realizaciones en el presente documento pueden permitir la descelularización del tejido, la descongelación del tejido y/o la reducción de la carga biológica del tejido sin calentar las muestras de tejido a una temperatura o durante un tiempo que pueda dañar las proteínas de la matriz extracelular del tejido. En ciertas realizaciones, se aplica una alta presión hidrostática a una tasa y a una presión máxima, de modo que la muestra de tejido no alcanza una temperatura superior a 30°C. En ciertas realizaciones, la temperatura no excede los 25°C.

En ciertas realizaciones de la divulgación, la aplicación de presión en un recipiente de presión hidrostática provoca la compresión adiabática de los materiales dentro del recipiente (es decir, el líquido), lo que hace que aumente la temperatura de los materiales comprimidos. Sin embargo, ciertos recipientes de presurización permiten cierta transferencia de calor a través de las paredes del recipiente, y por lo tanto, tales sistemas no son verdaderamente adiabáticos. Por lo tanto, en diversas realizaciones, la cantidad de aumento de presión está relacionada con la tasa de compresión (es decir, el aumento de presión) y la transferencia de calor hacia o desde las paredes del recipiente. Además, en diversas realizaciones, los cambios de fase del agua dentro del recipiente también pueden afectar a la temperatura dentro del recipiente. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la temperatura de la muestra que se está tratando con alta presión hidrostática puede controlarse controlando la tasa de aumento de presión en el recipiente de tratamiento.

En ciertas realizaciones de la divulgación, la muestra de tejido, el líquido contenido en un recipiente de presurización y/o el equipo de presurización se pueden enfriar antes y/o durante la aplicación de una alta presión hidrostática. En algunas realizaciones, puede disponerse hielo en el líquido contenido en el recipiente de presurización, y/o las paredes del recipiente de presurización pueden enfriarse.

En diversas realizaciones de la divulgación, para prevenir el daño tisular, la degradación y/o el crecimiento microbiano, a menudo es deseable congelar muestras de tejido durante el procesamiento, transporte y/o almacenamiento. En diversas realizaciones, durante el procesamiento o uso posterior, la muestra de tejido se descongela. Pero, en ciertos casos, la descongelación por calentamiento de la muestra de tejido puede dañar los componentes de la matriz extracelular del tejido y/o promover el crecimiento microbiano. Además, en ciertas realizaciones, descongelar muestras de tejido bajo condiciones relativamente frías (por ejemplo, bajo refrigeración o justo por encima del punto de congelación del agua en la muestra) puede llevar mucho tiempo, especialmente para muestras de tejido más grandes.

En ciertas realizaciones de la divulgación, un procedimiento para descongelar una muestra de tejido comprende proporcionar una muestra de tejido que comprende un tejido de mamífero que está al menos parcialmente congelado en un líquido y aplicar una presión al líquido suficiente para descongelar la muestra de tejido congelado. En algunas realizaciones, la descongelación se produce dentro de un tiempo limitado y/o con solo una elevación limitada de la temperatura de la muestra de tejido.

La Fig. 1 proporciona un diagrama de fases para las fases sólidas y líquidas del agua. Como se muestra, el punto de fusión de varias fases de hielo disminuye a presiones más altas. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la aplicación de presiones hidrostáticas elevadas a muestras que contienen hielo puede causar la conversión del agua en estado sólido a líquido sin un calentamiento significativo de la muestra de tejido.

En diversas realizaciones de la divulgación, una muestra de tejido puede contener agua que está parcial o totalmente en estado sólido (es decir, hielo). En diversas realizaciones, descongelar la muestra de tejido comprende hacer que una porción o sustancialmente toda el agua en estado sólido de la muestra se convierta en líquido. En algunas realizaciones, descongelar la muestra de tejido congelado comprende hacer que más del 50% del agua en estado sólido en la muestra de tejido sufra una transformación de fase a un estado líquido. En algunas realizaciones, descongelar el tejido congelado comprende hacer que sustancialmente toda el agua en estado sólido en la muestra de tejido experimente una transformación de fase a un estado líquido. En diversas realizaciones, entre el 50% y el 100% del hielo en la muestra sufre una transformación de fase a un estado líquido.

En diversas realizaciones de la divulgación, se puede determinar de varias maneras la cantidad de hielo en estado sólido en la muestra antes y después de la aplicación de un tratamiento de alta presión hidrostática. Por ejemplo, en varias realizaciones, la presencia de hielo en una muestra puede determinarse utilizando muestras pequeñas por la calorimetría diferencial de barrido (DSC). Para muestras más grandes, en diversas realizaciones, el hielo puede identificarse colocando una muestra en un líquido aislado térmicamente a una temperatura conocida y suministrando calor al sistema. En ciertas realizaciones, las muestras pueden comprimirse (presurizarse) en un sistema adiabático, y la temperatura de la muestra o la temperatura de un medio fluido que circunda la muestra se puede medir durante la compresión. Se espera que las muestras que no tienen hielo aumenten su temperatura en un sistema adiabático a una tasa constante relacionada con la tasa de presurización. En ciertas realizaciones, para muestras que contienen hielo, la temperatura de las muestras se estabilizará a una temperatura cercana al punto de fusión del hielo. En algunas realizaciones, si se mide la temperatura del fluido que circunda la muestra, la temperatura del fluido aumentará más lentamente para las muestras que contienen hielo que para las muestras que no contienen hielo. La meseta en la temperatura de la muestra y/o la disminución en la tasa de aumento de la temperatura dependerá de la cantidad de hielo presente.

En algunas realizaciones de la divulgación, la temperatura de una muestra de tejido que se somete a un tratamiento de alta presión hidrostática se mantiene por debajo de un límite superior. En algunas realizaciones, el límite superior se basa en la temperatura inicial de la muestra. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la descongelación del tejido se realiza sin aumentar la temperatura de la muestra de tejido más de 10°C. En algunas realizaciones, la descongelación se realiza sin aumentar la temperatura por encima de 30 °C. En algunas realizaciones, la descongelación se realiza sin aumentar la temperatura por encima de 25°C. En ciertas realizaciones, la descongelación se realiza sin aumentar la temperatura de la muestra de tejido por encima de entre aproximadamente 25°C y 30°C.

En algunas realizaciones de la divulgación, la descongelación se realiza sin aumentar la temperatura por encima de un límite superior, y dentro de un cierto tiempo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la descongelación se produce dentro de los 30 minutos. En ciertas realizaciones, la descongelación se produce dentro de los 60 minutos. En diversas realizaciones, la descongelación se produce entre aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 60 minutos.

En diversas realizaciones de la divulgación, el tratamiento a alta presión hidrostática se realiza para obtener un cierto nivel de reducción en la carga biológica de la muestra. Por ejemplo, en varias formas de realización, la presión hidrostática alta se puede aplicar a una presión y tiempo suficientes para provocar una presión y tiempo suficientes para causar al menos una reducción logarítmica de 5, una reducción logarítmica de 6, una reducción logarítmica de 7 o una reducción logarítmica de 8 en la carga bacteriana de una muestra. En algunas realizaciones, se puede aplicar una alta presión hidrostática a una presión y tiempo suficientes para reducir la carga biológica a un nivel particular.

En diversas realizaciones de la divulgación, la carga biológica de una muestra de tejido puede medirse extrayendo microbios de una muestra de tejido y cultivando o cuantificando un tipo particular de organismo. Un procedimiento adecuado para extraer microbios de una muestra incluye lavar una muestra con un líquido estéril y cultivar una porción o todo el líquido usado para lavar la muestra para cuantificar la cantidad de cualquier microbio o microbios en particular en una muestra. En diversas formas de realización, el fluido de lavado se puede seleccionar en función del tipo de microbio que se va a cuantificar y/o para evitar daños en el tejido. En algunas realizaciones, la reducción de la carga biológica se realiza sin aumentar la temperatura por encima de 30°C. En algunas realizaciones, la reducción de la carga biológica se realiza sin aumentar la temperatura por encima de 25°C. En ciertas realizaciones, la reducción de

la carga biológica se realiza sin aumentar la temperatura de la muestra de tejido por encima de entre aproximadamente 25°C y 30°C.

5 En algunas realizaciones, se puede realizar un proceso de esterilización antes o después de aplicar una alta presión hidrostática a una muestra de tejido. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la aplicación de alta presión hidrostática reducirá al menos parcialmente la carga biológica de una muestra de tejido, y se puede llevar a cabo un proceso de esterilización de tejidos para reducir aún más la carga biológica en la muestra. En algunas realizaciones, el proceso de esterilización puede ser un proceso de esterilización terminal que se realiza justo antes o después de empaquetar una muestra de tejido. Tal como se usa en el presente documento, un "proceso de esterilización" puede incluir cualquier proceso que reduzca la carga biológica en una muestra, pero que no sea necesario que la muestra sea completamente estéril.

15 Ciertos procesos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, un proceso de irradiación gamma, un proceso de irradiación con haz de electrones, un proceso de esterilización con dióxido de carbono supercrítico y un proceso de tratamiento con ácido peracético. En diversas realizaciones, dichos procesos pueden dañar algunos componentes del tejido y, por lo tanto, para producir tejidos con las propiedades biológicas deseadas, puede ser deseable limitar el tiempo o la intensidad (por ejemplo, dosis de radiación o pH) del proceso de esterilización. En ciertas realizaciones, la aplicación de alta presión hidrostática a una muestra para reducir parcialmente la carga biológica puede, por lo tanto, reducir la dosis de los procesos de esterilización posteriores utilizados para lograr un nivel deseado de esterilidad. Los procesos de esterilización adecuados incluyen, pero no se limitan a, los descritos, por ejemplo, en la publicación de patente de Estados Unidos nº 2006/0073592A1, de Sun et al.; Patente de Estados Unidos nº 5.460.962, de Kemp; Publicación de Patente de Estados Unidos nº 2008/0171092A1, de Cook et al.

Ejemplo 1: Reducción en la carga biológica del tejido

25 Se utilizó piel porcina. El tejido se proporcionó como piel completa con el cabello intacto o como capas dérmicas que se aislaron de la epidermis y capas de grasa subdérmica. La capa dérmica se aisló cortando la grasa subdérmica y una capa delgada (1-2 mm) de la dermis inferior de la dermis, y cortando una capa delgada (0,25-1 mm) de la epidermis y la dermis superior de la dermis. El pelo se eliminó mecánicamente antes de aislar la dermis. Ambos tipos de muestras se congelaron previamente, y para aumentar los niveles de carga biológica en el tejido de la dermis aislada, todo el tejido se almacenó junto (piel entera y dermis aislada) durante varios días después de la descongelación en condiciones de refrigeración. Cada pieza se empacó individualmente utilizando un dispositivo para conservar alimentos DENI™ Magic Vac. Cada pieza se selló dentro de tres bolsas selladas al vacío para evitar la exposición del tejido porcino al recipiente de presurización. Las muestras se empaquetaron con una cantidad mínima de líquido en la bolsa sellada, de manera que el paquete se ajustara a la muestra.

40 Para los experimentos se utilizó un sistema de presurización de 13 litros fabricado por ElmHurst Research, Inc (Albany, NY). El sistema tenía un volumen fijo y una presión aplicada al bombear fluido en el recipiente. La temperatura se midió utilizando un termopar que sobresalía de la tapa del recipiente en la cámara de presurización para medir la presión del fluido en masa.

45 Las piezas pequeñas de piel entera y dermis aislada se ensayaron primero (series 1 y 2), y las piezas grandes sin pelo fueron expuestas a las mismas condiciones (series 3 y 4). La tabla 1 resume estas condiciones. El recipiente a presión no tenía un sistema de control de temperatura, por lo que la temperatura máxima dependía principalmente de la temperatura inicial y la presión máxima. La tasa de aumento de presión fue a una velocidad única de 350 PSI/seg. Después de las series 1 y 2, los pequeños trozos de tejido que fueron expuestos a una alta presión hidrostática se examinaron a simple vista y se detectaron signos evidentes de degradación. No se observaron signos evidentes de degradación, por lo que los grandes trozos de tejido se procesaron en las series 3 y 4.

Nº de serie	Presión (PSI)	Tiempo (min)	Temp. de inicio (C)	Temperatura máxima (C)
1 y 3	60.000	5	27,0 y 25,3	38,7 y 38,8
2 y 4	75.000	10	26,8 y 25,7	39,9 y 40,5

50 Después de la exposición, las muestras de tejido se almacenaron en condiciones de refrigeración (1-10°C) durante menos de 1 semana. Se enviaron muestras de toda la piel y dermis aislada para ensayos de carga biológica. Las muestras se agitaron en una solución de PBS para extraer las bacterias de las muestras, y la solución de PBS se dispuso en una placa de agar y se incubó. Se contaron las colonias bacterianas. Las muestras de control de tejido no tratado (tanto la dermis aislada como de la piel completa) también se sometieron a los mismos ensayos de carga biológica antes de la exposición a una presión hidrostática alta.

Después de la refrigeración, algunas muestras de tejido dérmico aisladas restantes también se sometieron a DSC. La DSC se realizó utilizando 12 - 23 mg de muestra en un calorímetro de barrido diferencial TA (TA Instruments, New Castle, Delaware).

5 Los resultados de los ensayos de carga biológica se muestran en las Figs. 2A y 2B. Los datos se muestran como unidades formadoras de colonias (UFC) por muestra de tejido, en la escala de LOG₁₀. Los resultados muestran al menos una reducción de 1 a 3 LOG₁₀ para tejido no depilado y una reducción de 4 a 5 LOG₁₀ para tejido dérmico aislado. Los resultados muestran que una presión más alta y tiempos de retención de presión más prolongados redujeron la carga biológica general más que una presión más baja y tiempos más cortos.

10 Hubo una reducción en la desactivación bacteriana con el tejido completo de la piel, en comparación con el tejido dérmico aislado a cada presión analizada (60 kPSI y 75 kPSI). Por lo tanto, para los injertos dérmicos, cortar la muestra de tejido para eliminar los componentes no dérmicos antes del tratamiento con alta presión hidrostática puede proporcionar una mejor reducción de la carga biológica.

15 En este trabajo, los datos de inactivación mostraron excelentes resultados para los cortos períodos ensayados. Sin embargo, las propiedades de DSC para las muestras procesadas indicaron algún daño térmico al tejido. Por ejemplo, las muestras sometidas a 65 kPSI durante 5 minutos o 70 kPSI durante 10 minutos tuvieron valores de umbral térmico en DSC que indicaron un alto nivel de colágeno desnaturalizado. Por lo tanto, se realizaron experimentos para evaluar el efecto de la alta presión hidrostática para la descelularización, descongelación o reducción de la carga biológica cuando se controló la temperatura de procesamiento.

Ejemplo 2: Control de temperatura de proceso

25 Se obtuvo tejido cutáneo porcino y se aisló tejido dérmico como se describió anteriormente en el Ejemplo 1. El tejido se almacenó a -80 °C antes de su uso. Las muestras se descongelaron luego en una incubadora convectiva mantenida a 7°C hasta 36 horas. Todas las muestras se cortaron en piezas cuadradas de aproximadamente 7 cm x 7 cm. Los paquetes se hicieron utilizando el empaquetado DENI™ Magic Vac para ajustarse a las dimensiones del tejido.

30 Las muestras de tejido se colocaron individualmente dentro de paquetes prefabricados. Luego se agregó PBS para casi llenar el paquete (al menos 50 ml en promedio). El PBS se desgasificó antes de colocarlo en los paquetes utilizando una bajada a vacío con agitación durante varias horas antes de su uso. La desgasificación se consideró completa cuando ya no se formaban burbujas de aire alrededor de la barra de agitación. Se eliminó la mayor cantidad de aire posible del paquete apretando el paquete, y el extremo abierto del paquete se selló con un sellador térmico.

35 Se usó hielo para enfriar el recipiente de alta presión hidrostática. Se requirieron aproximadamente 50 libras de hielo para un total de tres series. El hielo se añadió al recipiente antes de la presurización, tanto por encima como por debajo del tejido. Se utilizó el mismo sistema de presurización descrito en el Ejemplo 1 para los experimentos descritos en el Ejemplo 2.

40 La Tabla 2 resume las condiciones para cada serie del Ejemplo 2. No se usó hielo de igual forma porque existía la preocupación de que habría fugas en el sellado del recipiente a temperaturas más bajas. Se utilizó más hielo a medida que aumentaba la confianza en la integridad del recipiente a baja temperatura. Por lo tanto, la temperatura inicial de cada serie fue más baja debido a que se usó más hielo.

45

Nº de serie	Presión (PSI)	Tiempo (min)	Temp. de inicio (C)	Temperatura máxima (C)
1	50.000	10	11,1	23,9
2	50.000	30	8,6	21,3
3	75.000	10	6,7	25,3
Nº de serie	Presión (PSI)	Tiempo (min)	Temp. de inicio (C)	Temperatura máxima (C)

50 Después de la aplicación de alta presión hidrostática, el tejido se almacenó en condiciones de refrigeración (1-10 °C) durante no más de 24 horas. Para controlar los efectos de la solución de PBS en el tejido durante el tiempo entre el empaquetado, el tratamiento y los ensayos de carga biológica, las muestras de control sin tratar se mantuvieron en PBS y se ensayaron con las muestras tratadas. Las muestras se cortaron tras una exposición a alta presión hidrostática en condiciones de esterilidad, lo que puede haber afectado los resultados de la carga biológica. La contaminación bacteriana se evaluó como en el Experimento 1.

55 El ensayo de carga biológica se realizó como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados del ensayo de carga biológica se muestran en la Fig. 3. Solo se analizó tejido dérmico aislado en este estudio, y el eje y representa las UFC en una

escala logarítmica. La reducción de la carga biológica mejoró con tiempos de retención más largos y presiones más altas. Por ejemplo, las series 1 y 3 se llevaron a cabo con tiempos de retención de 10 minutos, pero la serie 3, que se realizó a una presión más alta, produjo una mayor reducción de la carga biológica. Además, las series 1 y 2 se llevaron a cabo a 50 kPSI, pero la serie 2, que se llevó a cabo durante un tiempo más prolongado, dio como resultado una mayor reducción de la carga biológica en comparación con la serie 1.

La Fig. 4 es un registro gráfico de la presión frente a la temperatura durante las tres series en este experimento y las cuatro series del Ejemplo 1. En el experimento actual, las temperaturas de la muestra no excedieron de aproximadamente 25°C. En el Ejemplo 1, la temperatura de la muestra superó los 35°C, e incluso 40°C para las presiones más altas. La zona plana en la parte superior de cada curva es una meseta de enfriamiento probablemente debido a la transferencia de calor hacia o desde el fluido a las paredes del recipiente durante el paso de retención de alta presión. Las paredes de acero del recipiente de alta presión comenzaron a temperatura ambiente, y la masa de las paredes de acero del recipiente proporcionó un sumidero de calor masivo o una fuente, dependiendo del gradiente térmico. El ejemplo 2 también tiene estas mesetas de enfriamiento, pero son menos pronunciadas.

La prueba de DSC también se realizó en cada muestra usando un calorímetro de barrido diferencial TA. Los resultados de DSC se muestran en la Tabla 3. También se muestra un control, muestra dérmica no tratada. A diferencia del Ejemplo 1, las muestras en el Ejemplo 2 no mostraron valores bajos de umbral térmico indicativos de desnaturalización del colágeno. Más bien, los valores de umbral térmico para las series 1 a 3 del ejemplo 2, fueron aproximadamente 59-60°C, lo que es similar a la muestra de control. Por lo tanto, la aplicación de alta presión hidrostática mientras se controlaba la temperatura de la muestra fue efectiva para reducir la carga biológica de la muestra sin causar una desnaturalización significativa del colágeno.

Muestra	Temperatura de desnaturalización inicial/entalpía
Control	60,47 / 59,17
1	59,84 / 52,32
2	59,92 / 59,83
3	60,05 / 44,43

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para descelularizar un tejido, que comprende:
5 aplicar una presión de al menos 200 MPa a un líquido que contiene una muestra de tejido que comprende dermis de mamíferos separada de la epidermis circundante durante un tiempo suficiente para destruir sustancialmente todas las células de tejido nativo dentro del tejido blando, en el que la destrucción de prácticamente todas las células incluye la ruptura de la membrana celular de las células tal que el lavado de la muestra de tejido en una solución salina permite la eliminación de al menos el 95% de las células de tejido nativo.
10
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la presión aplicada al líquido es de al menos aproximadamente 500 MPa.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la presión aplicada al líquido es al menos 300 MPa durante
15 al menos 30 minutos.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la presión aplicada al líquido es al menos 400 MPa durante al menos 10 minutos.
- 20 5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la presión aplicada al líquido es al menos 400 MPa durante al menos 30 minutos.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el líquido comprende una solución salina acuosa.
- 25 7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que el líquido comprende solución salina tamponada con fosfato.
8. El procedimiento de la reivindicación 1, que además comprende realizar un proceso de esterilización en el tejido, de forma opcional
30 en el que el proceso de esterilización comprende un proceso de irradiación gamma, o en el que el proceso de esterilización comprende un proceso de irradiación con haz de electrones, o en el que el proceso de esterilización comprende un proceso de esterilización con dióxido de carbono supercrítico, o en el que el proceso de esterilización comprende un proceso de tratamiento con ácido peracético.
- 35 9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la dermis comprende dermis porcina.
10. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además eliminar una capa epidérmica circundante de la dermis antes de aplicar la presión.
- 40 11. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además lavar el tejido de mamífero para eliminar las células destruidas; y realizar al menos un proceso de descelularización adicional en la muestra de tejido.

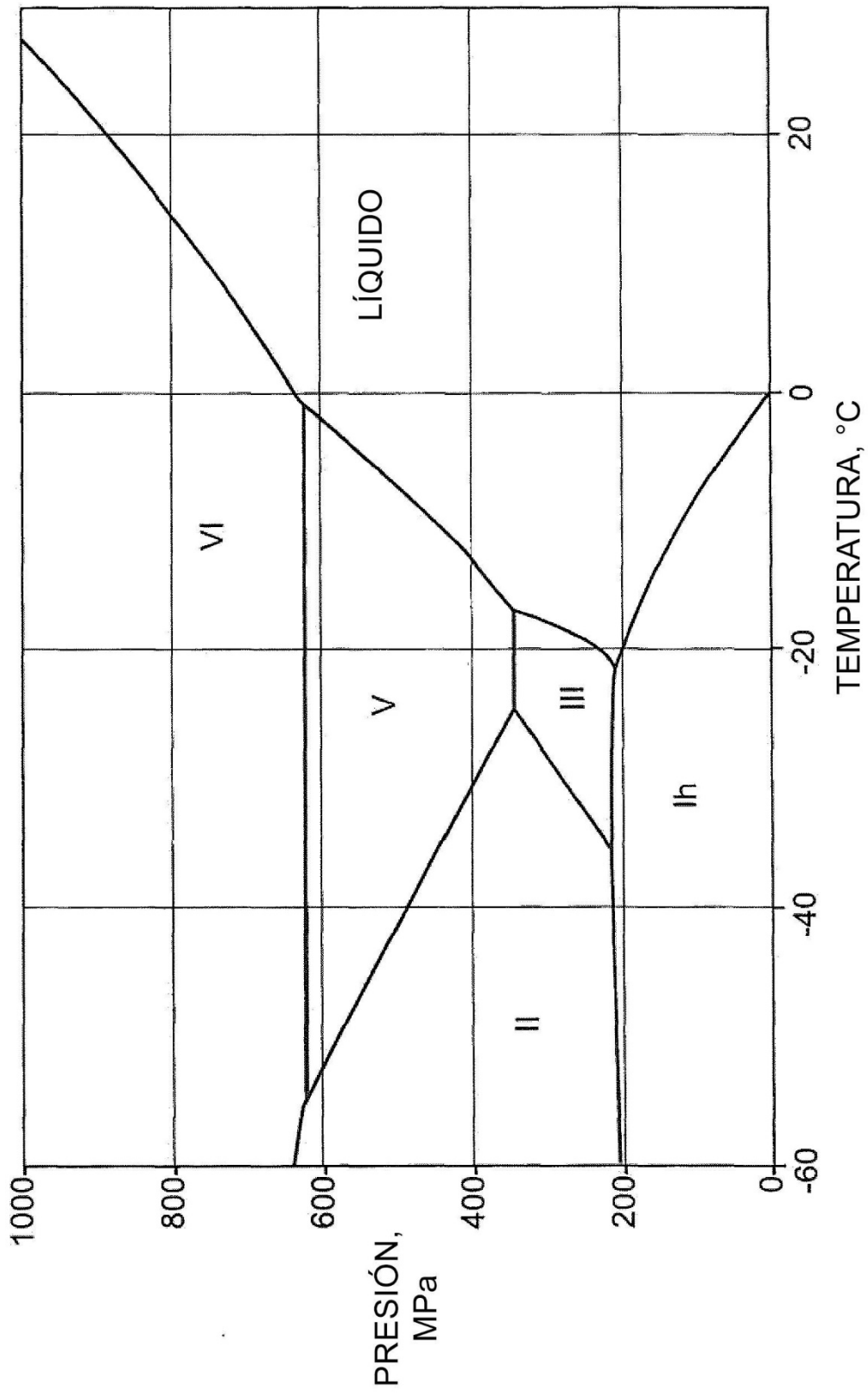


FIG. 1

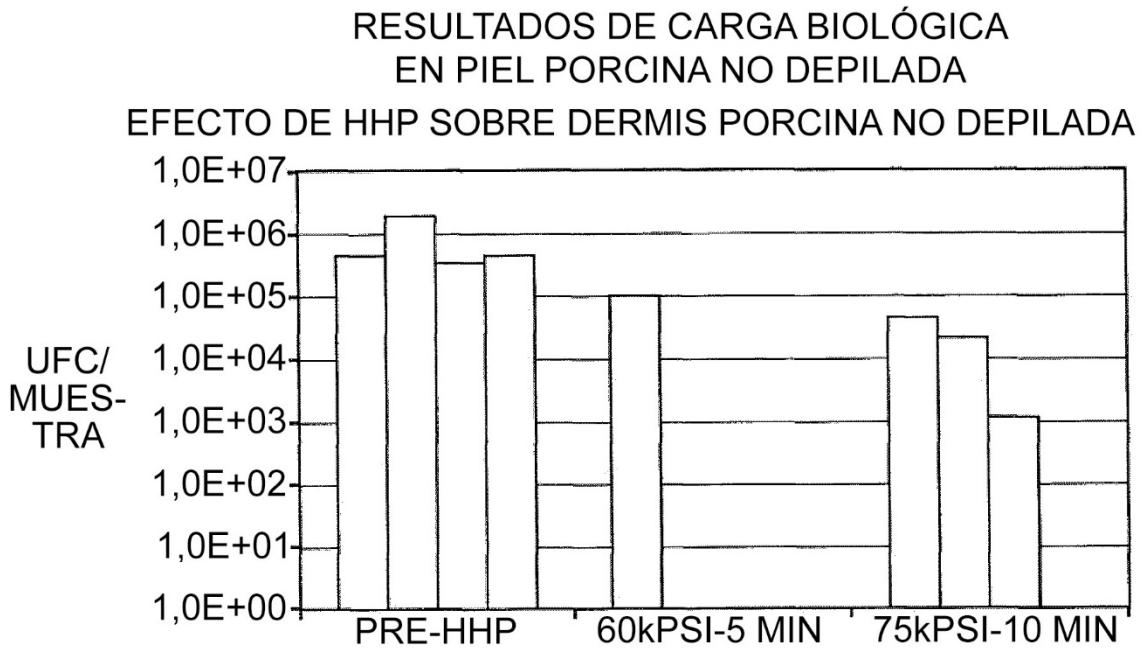


FIG. 2A

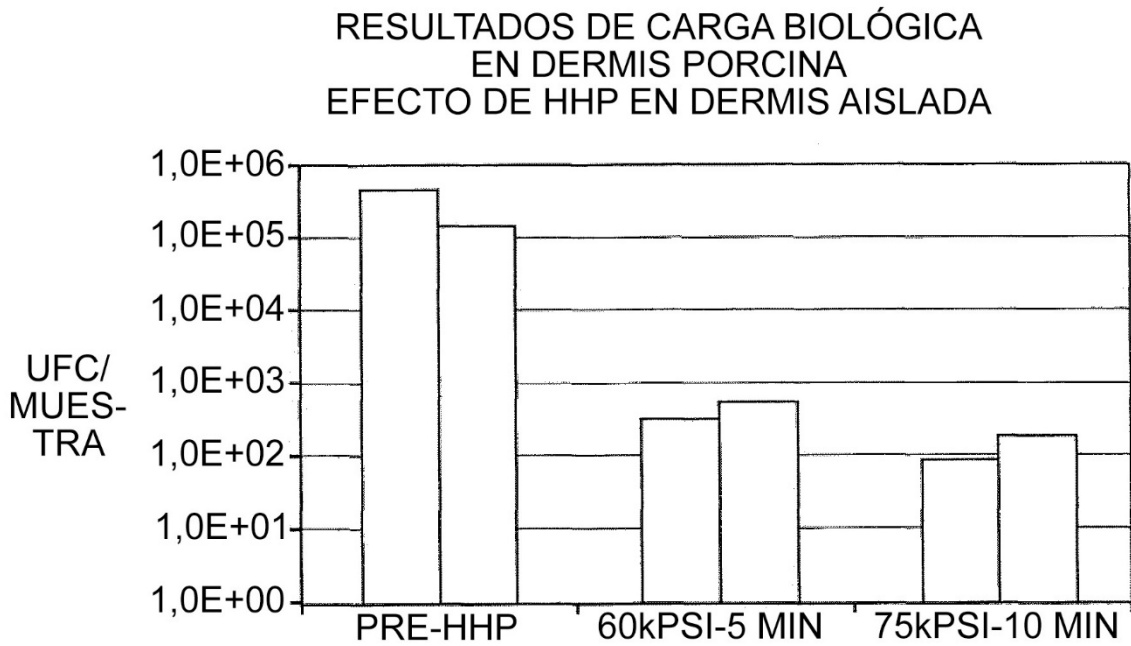


FIG. 2B

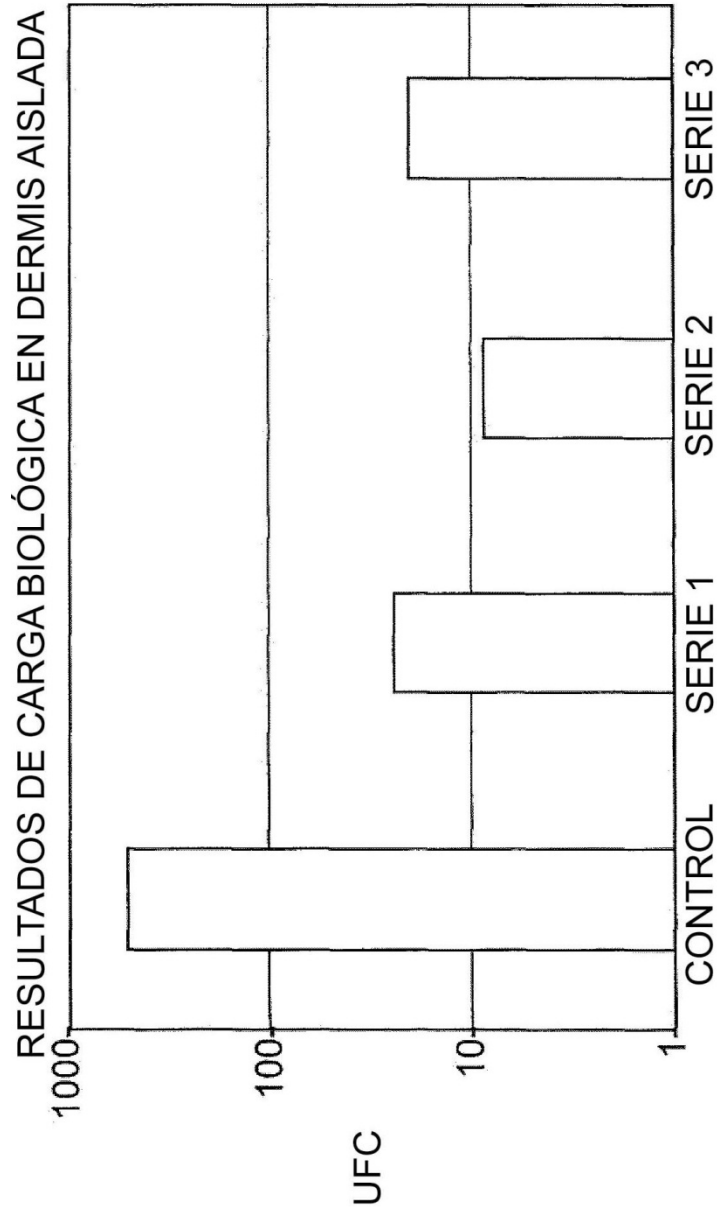


FIG. 3

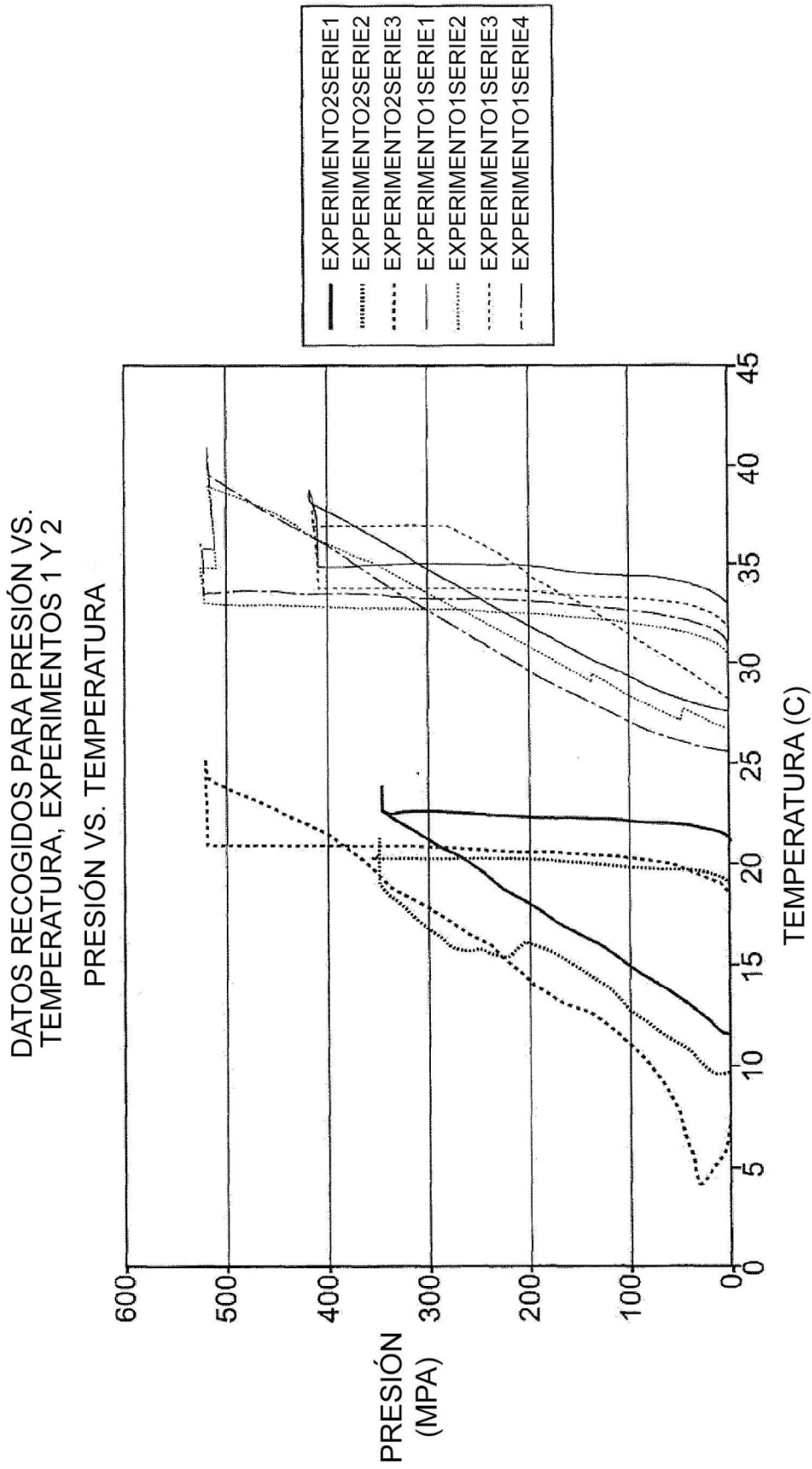


FIG. 4