

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 441**

51 Int. Cl.:

A61L 27/36

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.09.2014** **PCT/US2014/054206**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.03.2015** **WO15035115**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.09.2014** **E 14776766 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2019** **EP 3030272**

54 Título: **Procedimiento de tratamiento enzimático de productos tisulares**

30 Prioridad:

05.09.2013 US 201314019274

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

19.02.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

CHEN, YI;
KABARIA, NIMESH;
WANG, KAI-ROY;
XU, HUI;
LEAMY, PATRICK;
WAN, HUA;
SUN, WENQUAN y
HUANG, LI TING

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

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

ES 2 743 441 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

Procedimiento de tratamiento enzimático de productos tisulares

La presente descripción se refiere a matrices tisulares, y más particularmente, a procedimientos para controlar las propiedades mecánicas y/o biológicas de las matrices tisulares mediante el tratamiento de las matrices con enzimas proteolíticas.

Se utilizan diversos productos derivados de tejidos para regenerar, reparar o tratar de otro modo tejidos y órganos enfermos o dañados. Dichos productos pueden incluir injertos de tejido intactos y/o acelulares o tejidos acelulares reconstituidos (por ejemplo, matrices acelulares dérmicas, intestino u otros tejidos, con o sin siembra de células). Dichos productos generalmente tienen propiedades mecánicas determinadas por la fuente de tejido (es decir, tipo de tejido y animal del que se origina) y los parámetros de procesamiento utilizados para producir los productos tisulares. Debido a que los productos tisulares a menudo se usan para aplicaciones quirúrgicas y/o reemplazo o aumento de tejido, las propiedades mecánicas de los productos tisulares son importantes. Por ejemplo, los cirujanos generalmente prefieren tejidos que se sienten como tejidos naturales y/o que son fáciles de manejar durante los procedimientos quirúrgicos. Sin embargo, algunos productos tisulares son indeseablemente rígidos y/o tienen una sensación antinatural. Por consiguiente, se proporcionan procedimientos para tratar productos tisulares para producir propiedades mecánicas más deseables.

Además, cuando se implantan en el cuerpo, los productos tisulares derivados de materiales exógenos (por ejemplo, tejidos de otros animales o pacientes, así como los tejidos procesados de cualquier tipo), pueden provocar una respuesta inflamatoria o inmune en el receptor. En algunos casos, una respuesta inmunitaria excesiva puede ser perjudicial, causar que el implante forme tejido cicatricial indeseable o impida la regeneración adecuada del tejido en el sitio de implantación. Por consiguiente, se proporcionan procedimientos para tratar productos tisulares para reducir o controlar la respuesta inmunitaria de los productos tisulares después de la implantación.

Un procedimiento para tratar una matriz tisular con una proteasa para producir la flexibilidad deseada se describe en el documento US2012/0276213 A1.

Sumario

De acuerdo con ciertas realizaciones, se proporciona un procedimiento para tratar una matriz tisular. El procedimiento comprende seleccionar una matriz dérmica que contiene colágeno y poner en contacto la matriz tisular con alcalasa, y tratar la matriz tisular con radiación, en la que la alcalasa se proporciona en condiciones suficientes para producir un nivel deseado de flexibilidad en la matriz tisular después del tratamiento con irradiación.

En otra realización, la alcalasa se proporciona en condiciones suficientes para producir un nivel deseado de flexibilidad en la matriz tisular y para aumentar la porosidad de la matriz tisular.

De acuerdo con ciertas realizaciones, el procedimiento incluye la etapa de realizar un ensayo para determinar si el contacto de al menos una matriz tisular que contiene colágeno con la al menos una enzima proteolítica ha alterado la al menos una matriz tisular que contiene colágeno para reducir una respuesta inmunitaria humana a la matriz tisular cuando la matriz tisular se implanta en un cuerpo humano. [

De acuerdo con ciertas realizaciones, un procedimiento puede comprender proporcionar alcalasa en condiciones que incluyen un tiempo de incubación en una solución que tiene una actividad alcalasa seleccionada para producir un aumento deseado en la flexibilidad de la matriz tisular medida por una prueba de drapeado sin producir degradación de colágeno.

Descripción de los dibujos

Las Figuras 1A-1D muestran matrices tisulares acelulares después del tratamiento con enzimas usando los procedimientos descritos en el Ejemplo 1, así como controles no tratados.

La Figura 2 es un diagrama de caja de datos de prueba de resistencia a la tracción para las muestras tratadas y control, de acuerdo con los procedimientos del Ejemplo 1.

La Figura 3 es un diagrama de caja de datos de prueba de resistencia de sutura para las muestras tratadas y control, de acuerdo con los procedimientos del Ejemplo 1.

La Figura 4 es un diagrama de caja de datos de prueba de resistencia al desgarro para las muestras tratadas y control, de acuerdo con los procedimientos del Ejemplo 1.

La Figura 5 es un diagrama de caja de datos de prueba de elasticidad para las muestras tratadas y control, de acuerdo con los procedimientos del Ejemplo 1.

La Figura 6 es un diagrama de caja de datos de prueba de resistencia a la fluencia para las muestras tratadas y control,

de acuerdo con los procedimientos del Ejemplo 1.

La Figura 7 ilustra los termogramas de DSC para tejidos no tratados y tejidos tratados usando bromelina y alcalasa, de acuerdo con el Ejemplo 2.2.

5 Las Figuras 8A-8B ilustran patrones de expresión de los marcadores de activación CD14 (A) y CD163 (B) en monocitos cocultivados con diversos tejidos, usando el ensayo de activación de monocitos descrito en el Ejemplo

Las Figuras 9A-F son secciones de hematoxilina y eosina (H&E) de pADM no tratada (9A-9C) y pADM tratada con enzima (9D-9F) después del explante, como se describe en el Ejemplo 2.5.

Las Figuras 10A-D son secciones de H&E de explantes de pADM no tratada (9A-9B) y pADM tratada con enzima (9C-9D), como se describe en el Ejemplo 2.5.

10 La Figura 11 es un gráfico de barras que muestra los resultados de la prueba de drapeado para matrices tisulares después del tratamiento con alcalasa utilizando los procedimientos descritos en el Ejemplo 3, así como los controles no tratados.

15 La Figura 12 es un gráfico lineal que muestra los resultados del ensayo de digestión con collagenasa para matrices tisulares después del tratamiento con alcalasa utilizando los procedimientos descritos en el Ejemplo 3, así como los controles no tratados.

La Figura 13 lustra los resultados de DSC, que incluyen la temperatura de inicio de desnaturalización para los tejidos no tratados y tejidos tratados usando alcalasa de acuerdo con el Ejemplo 2

La Figura 14 es un gráfico de intervalo de carga máxima/ancho de unidad para matrices tisulares después del tratamiento con alcalasa utilizando los procedimientos descritos en el Ejemplo 3, así como los controles no tratados.

20 La Figura 15 es un gráfico de intervalo de elasticidad para matrices tisulares después del tratamiento con alcalasa utilizando los procedimientos descritos en el Ejemplo 3, así como los controles no tratados.

Descripción de ciertos ejemplos de realización

25 A continuación se hará referencia en detalle a ciertos ejemplos de realizaciones de acuerdo con la presente descripción, cuyos ejemplos se ilustran en los dibujos acompañantes. Siempre que sea posible, se utilizarán los mismos números de referencia en todos los dibujos para referirse a las partes iguales o similares.

En esta solicitud, el uso del singular incluye el plural a menos que se indique específicamente lo contrario. 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 la presente incluye los puntos finales y todos los valores entre los puntos finales.

30 Como se usa en la presente, "producto tisular" se referirá a cualquier tejido humano o animal que contiene proteínas de matriz extracelular. Los "productos tisulares" pueden incluir matrices tisulares acelulares o parcialmente descelularizadas, matrices tisulares descelularizadas que se han repoblado con células exógenas y/o tejidos celulares.

35 Como se usa en la presente, "matriz tisular" se refiere a la matriz extracelular, que incluye colágeno para un tejido dado, en el que la matriz retiene las características de matriz de colágeno estructural interconectadas de la matriz extracelular nativa del tejido del que se deriva. "Matriz tisular acelular" se refiere a una "matriz tisular" de la que se han eliminado las células de tejido nativas.

40 Se pueden usar diversos tejidos humanos y animales para producir productos para el tratamiento de pacientes. Por ejemplo, se han producido varios productos tisulares 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, por traumatismo, cirugía, atrofia y/o desgaste y degeneración a largo plazo). Dichos productos pueden incluir, por ejemplo, matrices tisulares acelulares, aloinjertos o xenoinjertos de tejido, y/o tejidos reconstituidos (es decir, tejidos al menos parcialmente descelularizados que se han sembrado con células para producir materiales viables).

45 Para aplicaciones quirúrgicas, a menudo es deseable producir productos tisulares que tengan ciertas propiedades mecánicas. Por ejemplo, el producto tisular, que puede incluir una lámina de material, debe poseer la resistencia suficiente para soportar las demandas de un uso previsto. Ciertos productos tisulares se pueden usar para reparar defectos (por ejemplo, hernias), para soportar tejidos o implantes circundantes (por ejemplo, para aumento y/o reconstrucción mamaria), o para reemplazar tejido dañado o perdido (por ejemplo, después de un trauma o resección quirúrgica). Cualquiera que sea el uso particular, el producto tisular debe tener suficiente resistencia, elasticidad y/u

50 otras propiedades mecánicas para funcionar hasta que ocurra la regeneración y/o reparación del tejido.

Además, los productos tisulares deben tener una sensación deseable. Por ejemplo, los cirujanos generalmente

prefieren materiales que tienen una sensación como tejido natural (por ejemplo, son suficientemente suaves, flexibles y/o elásticos). Además, después de la implantación, es deseable que los productos tisulares se sientan naturales. Por ejemplo, los tejidos utilizados para el aumento de mamas no deben ser excesivamente rígidos, de modo que al implantarlos produzcan una mama con sensibilidad natural.

5 Sin embargo, algunos productos tisulares pueden ser excesivamente rígidos para algunas aplicaciones. Por ejemplo, algunos cirujanos notan que los materiales dérmicos derivados de porcinos como STRATTICE™ son menos flexibles que los productos dérmicos humanos tales como ALLODERM®. Sin embargo, los procesos para mejorar la sensación al tacto de dichos productos no deberían afectar negativamente las propiedades biológicas y/o mecánicas de los productos. Específicamente, el procesamiento de los productos para mejorar el tacto de los productos no debería producir una disminución indeseable de otras propiedades mecánicas, tales como la resistencia a la tracción, y no debería alterar la matriz de proteínas de tal manera que el material no sea compatible con la regeneración y/o reparación del tejido.

15 La presente descripción proporciona procedimientos para tratar tejidos para controlar la sensación al tanto de los productos tisulares producidos a partir de los tejidos. La descripción también proporciona productos tisulares producidos usando los procedimientos de tratamiento. Además, la presente descripción proporciona procedimientos para tratar tejidos para controlar la porosidad de los productos tisulares producidos a partir de los tejidos. En algunos casos, el control de la porosidad puede mejorar la infiltración celular y la regeneración y/o reparación de tejidos.

20 Además, la presente descripción proporciona procedimientos para controlar o reducir la respuesta inmunitaria a las matrices tisulares cuando se implanta en un cuerpo. La respuesta inmunitaria se puede medir usando varios inmunoensayos, que incluyen ensayos de activación de monocitos, ensayos de fagocitosis y/o ensayos de estallido oxidativo. La inmunogenicidad también se puede controlar mientras se trata el tejido para mejorar la sensación del tejido, para controlar las propiedades mecánicas del tejido (que incluyen cualquier propiedad mecánica enumerada en la presente) y/o para controlar la porosidad del tejido. Después del tratamiento de las matrices tisulares, las matrices se pueden someter a un ensayo para determinar si la inmunogenicidad del tejido se ha alterado de una manera deseable.

25 De acuerdo con ciertas realizaciones, se proporciona un procedimiento para tratar una matriz tisular. El procedimiento puede comprender seleccionar una matriz dérmica; y poner en contacto la matriz dérmica con alcalasa en condiciones que incluyen un tiempo de incubación en una solución que tiene una actividad de alcalasa seleccionada para producir un aumento deseado en la flexibilidad de la matriz tisular medida por una prueba de drapeado sin producir degradación de colágeno significativa.

30 En ciertas realizaciones, las condiciones de tratamiento enzimático se seleccionan para proporcionar una reducción deseada en un valor de drapeado. Como se usa en la presente, la "prueba de drapeado" implica colocar (cubrir) una muestra de matriz tisular con un área circular conocida sobre un pedestal circular que tiene un diámetro conocido. El área proyectada de la matriz dérmica después de que cubre el pedestal se divide por el área original del círculo de la matriz tisular para determinar el valor de drapeado. Cabe señalar que el área del pedestal se resta del área original del disco y el área drapeada antes de dividir estas dos áreas para determinar el drapeado. Un valor más bajo de drapeado significa un material más blando (más capacidad de drapeado).

35 En ciertas realizaciones, la enzima es alcalasa y las condiciones de tratamiento se seleccionan para producir una reducción en el valor drapeado usando una muestra de matriz tisular de 60 mm de diámetro y un pedestal de 19 mm de entre 10-90%, entre 20-80%, entre 30 -70%, entre 40-60%, o aproximadamente 50% (por ejemplo, 45-55%), o al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60% o al menos 70%. Además, en algunas realizaciones, las condiciones se seleccionan para producir un valor de drapeado para un tejido acelular dérmico de entre 0.2-0.4, o entre 0.25-0.35, o menor de 0.4, menor de 0.35, menor de 0.3, o menor de 0.2.

40 Una variedad de factores puede afectar el valor de drapeado final. Por ejemplo, los factores que pueden variar para controlar el efecto sobre la flexibilidad del tejido pueden incluir, por ejemplo, temperatura, pH, solución o tampón utilizado, concentración enzimática, tipo específico de alcalasa utilizada, cantidad de solución en comparación con la cantidad de tejido y/o presencia de inhibidores de enzimas en la solución.

45 Como se analiza con más detalle a continuación, se ha descubierto que la alcalasa tiene una serie de beneficios en el tratamiento de matrices dérmicas. Por ejemplo, en tiempos de incubación y actividades enzimáticas relativamente bajas, se ha demostrado que la alcalasa proporciona un aumento sustancial en la flexibilidad del tejido y mejora en las pruebas de drapeado de la matriz del tejido (es decir, proporciona una mayor capacidad de drapeado) sin causar alteraciones inaceptables en la estructura o deterioro del colágeno en otras propiedades del tejido, tales como resistencia a la tracción, elasticidad, resistencia al desgarro, resistencia a la sutura, resistencia a la fluencia, resistencia a la estallido, temperatura de transición térmica, susceptibilidad a la colagenasa o combinaciones de las mismas.

50 Como se describe en detalle en el Ejemplo 3, se ha encontrado que el tratamiento con alcalasa seguido de irradiación (por ejemplo, como una etapa de esterilización terminal) tiene efectos variables sobre las propiedades mecánicas del tejido en función de las variaciones en las condiciones de procesamiento de enzimas. Por ejemplo, con concentraciones de enzimas relativamente bajas y tiempos de tratamiento, seguidos de irradiación, el tejido resultante

tiene un aumento inicial en la flexibilidad del tejido, que alcanza su punto máximo en cierto punto, como se muestra, por ejemplo, en la Figura 11. Con el tratamiento de alcalasa adicional (por ejemplo, para tiempos de tratamiento más largos o con mayor actividad enzimática), la irradiación posterior provoca una pérdida de flexibilidad. Por consiguiente, en algunas realizaciones, los procedimientos pueden comprender seleccionar una matriz dérmica; y poner en contacto la matriz dérmica con alcalasa; y tratar la matriz tisular con radiación, en la que la alcalasa se proporciona en condiciones seleccionadas para producir una flexibilidad de matriz tisular deseada después del tratamiento con radiación.

Para mantener la estabilidad de la matriz extracelular implantada *in vivo*, es deseable mantener la estabilidad del colágeno durante el procesamiento. La temperatura de inicio de desnaturalización del colágeno por DSC y la pérdida de peso durante el tratamiento con la enzima colagenasa son indicadores de la estabilidad del colágeno. Como se usa en la presente, "degradación inaceptable en la estructura del colágeno tisular" significa un cambio en la temperatura de inicio de desnaturalización del colágeno DSC mayor de 1 °C, mayor de 2 °C, mayor de 3 °C o mayor de 4 °C, o mayor de 5 °C.

Se pueden usar diversas actividades de alcalasa y tiempos de tratamiento. Por ejemplo, la alcalasa se puede proporcionar en una solución con una actividad de 1×10^{-6} unidades Anson por ml a 0,015 unidades Anson por ml, una actividad de 1×10^{-6} unidades a $1,5 \times 10^{-3}$ unidades Anson por ml, o una actividad de aproximadamente 2×10^{-5} unidades Anson por ml a aproximadamente 4×10^{-5} unidades Anson por ml. Además, los tiempos de tratamiento pueden variar entre aproximadamente 4 horas y 5 días.

Se proporciona un procedimiento para tratar una matriz tisular. El procedimiento puede comprender seleccionar una matriz tisular que contiene colágeno y poner en contacto la matriz tisular con alcalasa en condiciones suficientes para producir un nivel deseado de flexibilidad en la matriz tisular. El procedimiento puede comprender seleccionar una matriz tisular acelular que contiene colágeno y poner en contacto la matriz tisular con alcalasa en condiciones suficientes para producir un nivel deseado de flexibilidad en la matriz tisular y aumentar la porosidad de la matriz tisular. Las Figs. 1A-1 D muestran matrices tisulares acelulares (STRATTICE™) después del tratamiento con enzimas usando los procedimientos de la presente descripción, así como controles no tratados. Como se muestra, las muestras tratadas son significativamente más flexibles que las muestras no tratadas.

En diversas realizaciones, el tratamiento de matrices tisulares con alcalasa proteolítica proporciona propiedades mecánicas mejoradas sin causar degradación en una o más propiedades biológicas. Por ejemplo, el tratamiento de las matrices tisulares puede producir la rigidez, sensibilidad, propiedades táctiles y/o porosidad deseadas sin causar inflamación aumentada o formación de cicatrices y/o sin causar una reducción en la capacidad de las matrices tisulares para promover el crecimiento y la regeneración celular.

Las matrices tisulares se pueden seleccionar para proporcionar una variedad de diferentes propiedades biológicas y mecánicas. Por ejemplo, se puede seleccionar una matriz tisular acelular u otro producto tisular para permitir el crecimiento y la remodelación del tejido para ayudar en la regeneración del tejido que normalmente se encuentra en el sitio donde se implanta la matriz. Por ejemplo, una matriz tisular acelular, cuando se implanta en o dentro de la fascia, se puede seleccionar para permitir la regeneración de la fascia sin fibrosis o formación de cicatriz excesiva. En ciertas realizaciones, el producto tisular se puede formarse a partir de ALLODERM® o STRATTICE™, que son matrices dérmicas acelulares humanas y porcinas, respectivamente. Alternativamente, se pueden usar otras matrices tisulares acelulares adecuadas, como se describe más adelante. Los tejidos se pueden seleccionar de una variedad de fuentes de tejido que incluyen piel (dermis o piel completa), fascia, tejido pericárdico, duramadre, tejido de cordón umbilical, tejido placentario, tejido de la válvula cardíaca, tejido de ligamentos, tejido adiposo, tejido de tendón, tejido arterial, tejido venoso, tejido conectivo neural, tejido vesical urinario, tejido uréter y tejido intestinal. Los procedimientos descritos en la presente se pueden usar para procesar cualquier tipo de tejido de colágeno y para cualquier producto de matriz tisular. Por ejemplo, Badylak et al. describen una serie de materiales de armazón biológicos, y los procedimientos de la presente descripción se pueden usar para tratar esos u otros productos tisulares 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, el producto tisular se puede proporcionar como una matriz tisular descelularizada. Las matrices tisulares acelulares adecuadas se describen más adelante. En otros casos, el procedimiento puede incluir además procesar el tejido intacto para eliminar células u otros materiales. Los tejidos se pueden descelularizar total o parcialmente para producir matrices tisulares acelulares o materiales tisulares extracelulares para ser utilizados por los pacientes. Por ejemplo, varios tejidos, tales como piel, intestino, hueso, cartílago, tejido adiposo, tejido nervioso (por ejemplo, fibras nerviosas o duramadre), tendones, ligamentos u otros tejidos se pueden descelularizar total o parcialmente para producir productos tisulares útiles para pacientes. En algunos casos, estos productos descelularizados se pueden usar sin la adición de materiales celulares exógenos (por ejemplo, células madre). En ciertos casos, estos productos descelularizados se pueden sembrar con células de fuentes autólogas u otras fuentes para facilitar el tratamiento. Los procesos adecuados para producir matrices tisulares acelulares se describen a continuación.

Se pueden usar varias enzimas diferentes para tratar las matrices tisulares. Por ejemplo, las enzimas adecuadas

pueden incluir sulfhidril proteasas tales como bromelina. Además, pueden incluir bromelina, papaína, ficina, actinidina, alcalasa, tripsina o combinaciones de las mismas. Las enzimas se pueden adquirir comercialmente o extraer de fuentes de fruta. Por ejemplo, una fuente de bromelina es MCCORMICK MEAT TENDERIZER®, pero las enzimas también se pueden extraer de la piña y/o comprar en una formulación de grado médico.

5 La alcalasa se puede poner en contacto con los tejidos para aumentar la flexibilidad del tejido sin causar una degradación indeseable en otras propiedades mecánicas y/o biológicas. Por ejemplo, cuando se produce un lote de materiales con o sin los tratamientos con enzimas alcalasas discutidas en la presente, los tratamientos enzimáticos no producirán un cambio indeseable en al menos uno de resistencia a la tracción, resistencia al desgarro, resistencia a la sutura, resistencia a la fluencia, elasticidad, susceptibilidad a colagenasa, resistencia al estallido, temperatura de transición térmica o combinaciones de los mismos. En algunos casos, un cambio indeseable es una reducción estadísticamente significativa en cualquiera de la resistencia a la tracción, resistencia al desgarro, resistencia a la sutura, resistencia a la fluencia, contenido de glucosaminoglicanos, contenido de lectina, resistencia al estallido, un aumento en la susceptibilidad a la colagenasa o un cambio (hacia arriba o hacia abajo) en la temperatura de transición térmica (medida con calorimetría diferencial de barrido).

15 Como se indicó anteriormente, en algunas realizaciones, los tejidos se tratan con una enzima para aumentar la porosidad del tejido. En diversas realizaciones, el aumento de la polaridad 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 regeneración del tejido.

En algunos casos, las enzimas se seleccionan de modo que causen la escisión específica de sitio 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 períodos de tiempo prolongados.

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

Como se señaló anteriormente, después del tratamiento con una enzima, se puede realizar un ensayo para determinar si el contacto de al menos una matriz tisular que contiene colágeno con la al menos una enzima proteolítica ha alterado la al menos una matriz tisular que contiene colágeno para reducir la respuesta inmunitaria humana a la matriz tisular cuando la matriz tisular se implanta en un cuerpo humano. Se pueden realizar varios ensayos adecuados. Por ejemplo, los ensayos adecuados pueden incluir ensayos de activación de monocitos, ensayos de fagocitosis y ensayos de estallido oxidativo.

En algunas realizaciones, el ensayo se puede realizar en un segmento o porción del tejido procesado, y se pueden usar otras porciones del tejido en procedimientos médicos o quirúrgicos posteriores. En otras realizaciones, el ensayo se puede realizar en una o más muestras de un lote de muestras múltiples, y las muestras no sometidas al ensayo se pueden seleccionar posteriormente para usar en el tratamiento de un paciente.

En ciertas realizaciones, el tratamiento enzimático se selecciona para eliminar colágeno u otras proteínas en el material que tiene una temperatura de transición térmica que permitirá la desnaturalización a la temperatura corporal. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se seleccionan tejidos acelulares dérmicos, y el tratamiento enzimático se selecciona para eliminar un pico térmico, medido usando DSC, entre aproximadamente 30 grados y 40 grados Celsius. Se espera que este pequeño pico de ECM se desnaturalice espontáneamente a la temperatura del cuerpo humano y pueda contribuir a las diferentes reacciones inflamatorias que ocurren después de la implantación.

Matrices tisulares acelulares

El término "matriz tisular acelular", como se usa en la presente, se refiere generalmente a cualquier matriz tisular que esté sustancialmente libre de células y/o componentes celulares. La piel, partes de la piel (por ejemplo, dermis) y otros tejidos tales como vasos sanguíneos, válvulas cardíacas, fascia, cartílago, tejido adiposo, hueso y tejido conectivo nervioso se pueden usar para crear matrices acelulares dentro del alcance de la presente descripción. Las matrices tisulares acelulares se pueden analizar o evaluar para determinar si están sustancialmente libres de células y/o componentes celulares de varias maneras. Por ejemplo, los tejidos procesados se pueden inspeccionar con microscopía óptica para determinar si quedan células (vivas o muertas) y/o componentes celulares. Además, ciertos ensayos se pueden usar 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 tisulares. En general, la ausencia de ADN u otros ácidos nucleicos restantes será indicativo de una descelerización completa (es decir, eliminación de células y/o componentes celulares). Finalmente, otros ensayos que identifican componentes específicos de la célula (por ejemplo, antígenos de superficie) se pueden usar para determinar si las matrices tisulares son acelulares. La piel, las partes de la piel (por ejemplo, dermis) y otros tejidos tales como vasos sanguíneos, válvulas cardíacas, fascia, cartílago, hueso y tejido conectivo nervioso se pueden usar para crear matrices acelulares dentro del alcance de la presente descripción.

En general, las etapas involucradas en la producción de una matriz tisular acelular incluyen la recolección del tejido de un donante (por ejemplo, un cadáver humano o una fuente animal) y la eliminación de células en condiciones que preservan la función biológica y estructural. En ciertas realizaciones, 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 realizaciones, la solución estabilizante detiene y previene la degradación osmótica, hipóxica, autolítica y proteolítica, protege contra la contaminación microbiana y reduce el daño mecánico que puede ocurrir con los tejidos que contienen, por ejemplo, componentes del 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 proteasa y/o uno o más relajantes de músculo liso.

El tejido se coloca posteriormente en una solución de descelularización para eliminar células viables (por ejemplo, células epiteliales, células endoteliales, células de músculo liso y fibroblastos) de la matriz estructural sin dañar la integridad biológica y estructural de la matriz de colágeno. La solución de descelularización puede contener un tampón apropiado, sal, un antibiótico, uno o más detergentes, uno o más agentes para evitar la reticulación, uno o más inhibidores de la proteasa y/o una o más enzimas. En algunas realizaciones, el tejido se incubaba en la solución de descelularización durante la noche a 37 °C con agitación suave a 90 rpm. En ciertas realizaciones, se pueden usar detergentes adicionales para eliminar la grasa de la muestra de tejido.

Después del proceso de descelularización, la muestra de tejido se lava completamente. En algunos ejemplos de realizaciones, por ejemplo, cuando se usa material xenogénico, el tejido descelularizado posteriormente se trata con una solución de desoxirribonucleasa (ADNasa). Se puede usar cualquier tampón adecuado siempre que el tampón proporcione una actividad de ADNasa adecuada.

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

La eliminación de los epítomos α -gal del material que contiene colágeno puede disminuir la respuesta inmunitaria contra el material que contiene colágeno. El epítomo α -gal se expresa en mamíferos no primates y en monos del Nuevo Mundo (monos de América del Sur), así como en macromoléculas tales como los proteoglicanos de los componentes extracelulares. U. Galili 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 simios) y en los seres humanos. Id. Los anticuerpos anti-gal se producen en seres humanos y primates como resultado de una respuesta inmunitaria 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 30 (1992).

Debido a 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 produce rechazo debido a la unión del anticuerpo anti-Gal de primates a estos epítomos del material que contiene colágeno. 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 produce una activación importante del sistema inmune para producir mayores cantidades de anticuerpos anti-gal de alta afinidad. Por consiguiente, en algunas realizaciones, cuando los animales que producen epítomos α -gal se usan 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 el impedimento de la reexpresión de los epítomos celulares α -gal pueden disminuir la respuesta inmunitaria contra el material que contiene colágeno asociado con la unión de anticuerpos anti- α -gal a los epítomos α -gal.

Para eliminar los epítomos α -gal, 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 realizaciones, la muestra de tejido se puede tratar con una enzima α -galactosidasa para eliminar epítomos α -gal si está presente en el tejido. En algunas realizaciones, 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 realizaciones, la concentración de α -galactosidasa se incrementa a 400 U/L para la eliminación adecuada de los epítomos de α -gal del tejido recolectado. Se puede usar cualquier concentración de enzima y tampón adecuados siempre que sea suficiente la eliminación de antígenos.

Alternativamente, en lugar de tratar el tejido con enzimas, los animales que se han modificado genéticamente para carecer de uno o más epítomos antigénicos se pueden seleccionar como la fuente de tejido. Por ejemplo, los animales (por ejemplo, cerdos) que se han modificado genéticamente para carecer del resto de α -galactosa terminal se pueden seleccionar como la fuente de tejido. Para obtener descripciones de los animales apropiados, ver la Solicitud U.S. en tramitación Serie Núm. 10/896.594 y la Patente U.S. N-um. 6.166.288. Además, ciertos ejemplos de procedimientos 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-a-(1,3)-Galactose and Retention of Matrix Structure," Tissue Engineering, Vol. 15, 1-13 (2009).

Después de que se forma la matriz tisular acelular, se pueden sembrar opcionalmente células viables histocompatibles en la matriz tisular acelular para producir un injerto que también se puede remodelar en el huésped. En algunas realizaciones, se pueden agregar células viables histocompatibles a las matrices mediante técnicas de cocultivo de células *in vitro* estándar antes del trasplante, o mediante repoblación *in vivo* después del trasplante. La repoblación *in vivo* puede ser por las propias células del receptor que migran a la matriz tisular acelular o por infusión o inyección de células obtenidas del receptor o células histocompatibles de otro donante en la matriz tisular acelular *in situ*. Se pueden usar varios tipos de células, que incluyen células madre embrionarias, células madre adultas (por ejemplo, células madre mesenquimáticas) y/o las células neuronales. En diversas realizaciones, las células se pueden aplicar directamente a la porción interna de la matriz tisular acelular justo antes o después de la implantación. En ciertas realizaciones, las células se pueden colocar dentro de la matriz tisular acelular para implantar y cultivar antes de la implantación.

Ejemplo 1: Tratamiento de matrices tisulares para aumentar la flexibilidad (ejemplo comparativo)

El siguiente ejemplo ilustra un proceso para tratar materiales que comprenden matrices acelulares dérmicas de porcino con bromelina para aumentar la flexibilidad del material. Como se describe a continuación, el tratamiento no causó un cambio indeseable en varias propiedades mecánicas. Además, el tratamiento aumenta la polaridad del material, lo que puede mejorar la tasa de infiltración celular y la regeneración de tejidos.

Para este experimento, se usaron matrices tisulares acelulares STRATTICE™, obtenidas de LIFECELL CORPO-RATION (Branchburg, NJ). STRATTICE™ está disponible en una forma flexible y una versión más firme. Ambos tipos se usaron para este experimento. Las muestras utilizadas para la prueba se cortaron en cuartos y se trataron tres cuartos. Las muestras no tratadas (1 cuarto) se usaron como controles. Los controles se refrigeraron durante el tratamiento. STRATTICE™ se envasa como solución y, por lo tanto, no requiere rehidratación. Las muestras tratadas se colocaron en 0,5 litros de agua fría del grifo que contenía MCCORMICK MEAT TENDERIZER.

Las Figuras 1A-1D muestran matrices tisulares acelulares después del tratamiento con enzimas usando procedimientos de la presente descripción, así como controles no tratados. Las Figuras 2-6 son gráficos de cajas de resistencia a la tracción, resistencia a la sutura, resistencia al desgarro, elasticidad y resistencia a la fluencia para cada muestra tratada y 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 o la susceptibilidad a la colagenasa. La prueba T pareada total no mostró diferencias estadísticas entre los grupos de control y tratamiento.

Ejemplo 2: tratamiento de las matrices tisulares para modular la respuesta inmunitaria después de la implantación

1. Preparación de la matriz dérmica acelular porcina (pADM)

La piel porcina se recolectó de un matadero, la epidermis y la grasa subcutánea se eliminaron físicamente. El tejido dérmico restante se descontaminó a 37 °C en PBS que contiene antibióticos durante 24 horas.

Después de la descontaminación, el tejido se procesó en condiciones asépticas. El tejido dérmico se descelularizó durante 24 horas con detergentes para eliminar las células viables, se lavó con solución salina y se trató con ADNasa/α-galactosidasa u otras 24 horas. Los desechos celulares y los productos químicos residuales se eliminaron mediante lavado en PBS. La matriz dérmica acelular porcina resultante (pADM) se almacenó a temperatura ambiente hasta su uso.

2. Preparación de pADM tratada con enzima (el tratamiento con bromelina es de referencia)

La pADM se trató con una de las dos enzimas proteasas (alcalasa o bromelina) durante la noche a 37 °C. La bromelina, a una concentración de 100 unidades/litro, se usó para tratar la pADM antes de la descelularización o después de la etapa de ADNasa/α-galactosidasa. La alcalasa se usó a una concentración de 0.003 unidades Anson/ml para tratar la pADM antes de la etapa de descelularización.

3. Calorimetría diferencial de barrido de muestras tratadas

El efecto del tratamiento con enzima bromelina sobre la ECM de tejido porcino se evaluó mediante análisis calorimétrico de barrido diferencial (DSC). Las muestras de tejido se sellaron herméticamente y se escanearon a 3 °C/min de 2 °C a 120 °C. Los termogramas de DSC para tejidos no tratados y tejidos tratados usando las enzimas (bromelina y alcalasa) de acuerdo con el Ejemplo 2.2 se muestran en la Fig. 7. Los termogramas demostraron algunas alteraciones en la ECM del tejido después del tratamiento con enzimas. Primero, en contraste con el tejido de control descelularizado y no tratado, la ECM tratada con enzima no mostró el pico pequeño (~2%) entre 30 °C y 40 °C. Se espera que este pequeño pico de ECM se desnaturalice espontáneamente a la temperatura del cuerpo humano y pueda contribuir a diferentes respuestas inflamatorias provocadas por pADM no tratada y tratada con enzimas. En

segundo lugar, los dos picos principales de ECM por encima de 55 °C se deprimieron ligeramente en 0,9 °C en promedio. Tercero, la entalpía de desnaturalización total de ECM se incrementó en un ~7,5% en promedio después del tratamiento con enzimas.

4. Activación de monocitos *in vitro*

- 5 Los monocitos son leucocitos que forman parte del sistema inmune innato. En respuesta a los agentes inflamatorios, se activan rápidamente e inician una respuesta inflamatoria. Para predecir las respuestas inflamatorias humanas a los tejidos tratados con enzimas y no tratados, se aislaron los monocitos de la sangre periférica humana y se incubaron con los tejidos durante la noche. Después de la incubación, las células se lavaron y se tiñeron con anticuerpos contra dos marcadores de superficie utilizados para controlar la activación, CD14 y CD163.
- 10 Después de la activación, los monocitos disminuyen la expresión de CD14 y CD163 en sus superficies. Este patrón de expresión se confirmó usando lipopolisacárido (LPS), un activador conocido de monocitos. Las Figs. 8A-8B ilustran patrones de expresión de los marcadores de activación CD 14 (A) y CD163 (B) en monocitos cocultivados con diversos tejidos. Los niveles de expresión de CD14 y CD163 en monocitos no inducidos (negro) sirven como controles negativos basales. A modo de comparación, los patrones de expresión de estos marcadores en monocitos no inducidos sirvieron como controles negativos. La pADM tratada con enzima indujo un nivel de activación mucho menor que la pADM no tratada, como lo demuestra el patrón de expresión de ambos marcadores. En efecto, el patrón y el nivel de expresión de CD14 en monocitos expuestos a pADM tratada con enzimas son muy similares a los de monocitos no inducidos. Los monocitos expuestos a la pADM tratada con enzimas tuvieron una ligera disminución de la expresión de CD163 pero en un grado mucho menor que los monocitos expuestos a la pADM no tratada o LPS.
- 20 Los resultados indican que la pADM tratada con enzima induce respuestas inflamatorias mínimas en monocitos humanos. Después de la activación de los monocitos, disminuyen las expresiones de CD14 y CD163. Este patrón se confirma mediante las células cocultivadas con un activador de monocitos conocido, lipopolisacárido (LPS). Las pADM no tratadas (rojo) muestran expresiones más bajas de CD14 y CD163 en comparación con la pADM tratada con enzimas (verde), lo que indica que el tratamiento con enzimas disminuye la activación de monocitos. Así, las pADM tratadas con enzima provocan menos respuesta inflamatoria en los monocitos humanos.

5. Rendimiento *in vivo* de pADM y pADM tratada con enzima

- Para evaluar el rendimiento *in vivo* de pADM y pADM tratada con enzima, se implantaron piezas de pADM y pADM tratada con enzima de 1 cm x 1 cm en tejido subcutáneo de ratas inmunocompetentes. A las dos y cuatro semanas después de la implantación, los tejidos se explantaron y procesaron para la evaluación histológica de inflamación, repoblación celular y revascularización.

- Las Figs. 9A-F son secciones de hematoxilina y eosina (H&E) de pADM no tratada (9A-9C) y pADM tratada con enzima (9D-9F) después del explante, como se describió anteriormente. Las figs. 10A-D son secciones H&E de explantes de pADM no tratadas (9A-9B) y pADM tratadas con enzimas (C-D), como se describió anteriormente. La pADM tratada con enzima indujo una inflamación mínima o nula, mientras que la pADM no tratada indujo respuestas inflamatorias de moderadas a altas caracterizadas por la presencia de abundantes células inmunes. Además, los explantes de pADM tratadas con enzimas exhibieron una repoblación y revascularización celular aumentadas en comparación con pADM no tratada. En la pADM no tratada, las células tipo fibroblastos y las estructuras vasculares estaban presentes principalmente en la periferia del tejido. En contraste, esas mismas células y estructuras vasculares se observaron en toda la pADM tratada con enzimas, incluso en el medio del tejido.

6. Ensayos de digestión con collagenasa

- Diferentes alícuotas de pADM liofilizadas y pADM tratadas con enzimas (usando bromelina, tripsina y alcalasa) se pesaron y digirieron con collagenasa tipo I durante períodos de tiempo variables. En cada punto de tiempo, algunas alícuotas de muestras digeridas se separaron de la solución de collagenasa I por centrifugación y se lavaron con agua para eliminar la solución residual de collagenasa I. Todas las alícuotas se liofilizaron y pesaron de nuevo. El porcentaje de matriz restante en cada punto de tiempo se calculó tomando la relación del peso seco de la muestra digerida al peso seco de la muestra inicial.

- El tratamiento con enzimas no tuvo un impacto negativo en la susceptibilidad de las pADM a la digestión con collagenasa. Tanto las pADM como las pADM tratadas con enzimas se digirieron con collagenasa Tipo I en el mismo grado y a la misma velocidad. Por consiguiente, se ha descubierto que los procedimientos de la presente descripción proporcionan propiedades inmunológicas mejoradas después de la implantación sin causa una degradación en la susceptibilidad a la collagenasa.

Ejemplo 3: Tratamiento de tejidos con actividad de alcalasa controlada

- La dermis porcina se trató con alcalasa que tiene una actividad variable de 3×10^{-5} a 0,015 unidades Anson/ml en una solución acuosa de pH aproximadamente neutro durante 16 horas. La dermis porcina se descelularizó, desinfectó y esterilizó posteriormente con haz de electrones para preparar una matriz dérmica acelular estéril. Se realizaron varias

pruebas de flexibilidad y elasticidad para estudiar el efecto de la alcalasa en varias propiedades mecánicas, estructurales y biológicas.

- 5 La Figura 11 es un gráfico de barras que muestra los resultados de la prueba de drapeado para matrices tisulares después del tratamiento con alcalasa usando los procedimientos descritos en el Ejemplo 3, así como controles no tratados. La prueba de drapeado implicó colocar un círculo de matriz dérmica de 60 mm de diámetro en la parte superior de un pedestal de 19 mm de diámetro. El área proyectada de la matriz dérmica después de que cubre el pedestal se dividió por el área original del círculo de 60 mm de diámetro para determinar el valor de drapeado. Cabe señalar que el área del pedestal se resta del área original del disco y el área drapeada antes de dividir estas dos áreas para determinar el drapeado. Un valor más bajo de drapeado significa un material más blando (más capacidad de drapeado). Los datos muestran que el drapeado disminuye significativamente (el material se ablanda) para la
- 10 concentración enzimática más baja de 3×10^{-5} unidades Anson/ml. Por encima de 3×10^{-5} unidades Anson/ml, en el tiempo de tratamiento, temperatura, y pH seleccionados, el valor del drapeado aumenta y parece alcanzar un plateau por encima de $1,5 \times 10^{-3}$ unidades Anson/ml.
- 15 La Figura 13 es un gráfico lineal que muestra los resultados del ensayo de digestión con collagenasa para matrices tisulares después del tratamiento con alcalasa usando los procedimientos descritos en el Ejemplo 3, así como los controles no tratados. Los datos muestran un perfil de digestión similar al control (matriz no tratada con enzimas) para las concentraciones más bajas de alcalasa con una tasa creciente de degradación para las matrices expuestas a concentraciones más altas de alcalasa.
- 20 La Figura 14 ilustra resultados de DSC, a saber, el inicio de la desnaturalización para tejidos no tratados y tejidos tratados usando alcalasa, de acuerdo con el Ejemplo 3. Similar a la estabilidad del colágeno medida usando pruebas de susceptibilidad a la collagenasa (Figura 13), el inicio de desnaturalización más bajo con concentraciones de alcalasa creciente indica una disminución de la estabilidad del colágeno en función de la concentración del tratamiento con alcalasas.
- 25 La Figura 15 es un gráfico de intervalo de carga máxima/ancho de unidad para matrices tisulares después del tratamiento con alcalasa usando los procedimientos descritos en el Ejemplo 3, así como los controles no tratados. Estos datos se generaron mediante pruebas de tracción de tiras de aproximadamente 1 cm de ancho de los materiales hasta el fallo mientras se mide la resistencia. Las pruebas se realizaron usando un sistema de prueba mecánica INSTRON. Los datos muestran una resistencia similar para todos los tratamientos.
- 30 La Figura 16 es un gráfico de intervalos de elasticidad para las matrices tisulares después del tratamiento con alcalasa usando los procedimientos descritos en el Ejemplo 3, así como los controles no tratados. La elasticidad es una medida de la rigidez del material a cargas más altas en la porción lineal de la curva de fuerza de desplazamiento. La elasticidad contrasta con la medición del drapeado, que refleja la rigidez a cargas muy bajas (la fuerza de gravedad sobre el tejido). No se observaron cambios significativos en la elasticidad entre los grupos de tratamiento.
- 35 La prueba muestra que el tratamiento con alcalasa aumenta eficazmente la flexibilidad de pADM con el tratamiento inicial, con el consiguiente aumento de la flexibilidad con el tratamiento continuado. Además, los bajos niveles de exposición a alcalasa no afectan negativamente la carga máxima, susceptibilidad a la collagenasa y elasticidad.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de tratamiento de una matriz tisular, que comprende:
seleccionar una matriz dérmica; y
poner en contacto la matriz dérmica con alcalasa; y
- 5 5 tratar la matriz tisular con radiación, en el que la alcalasa se proporciona en condiciones seleccionadas para producir una flexibilidad de matriz tisular deseada después del tratamiento con radiación.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las condiciones se seleccionan para proporcionar un aumento sustancialmente máximo en la flexibilidad del tejido.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que la matriz tisular es una matriz tisular no de primate, particularmente en el que la matriz tisular es una matriz tisular de porcino.
- 10 4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que incluye además tratar la matriz tisular para eliminar al menos algunas de las células y componentes celulares de la matriz tisular.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, que incluye la eliminación de todas las células y componentes celulares de la matriz tisular.
- 15 6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la matriz tisular es una matriz tisular acelular.
7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que poner en contacto la matriz tisular con alcalasa incluye poner en contacto la matriz tisular con una solución que tiene alcalasa con una actividad de 1×10^{-6} unidades a 0,015 unidades Anson/ml, o con una actividad de 1×10^{-6} unidades a $1,5 \times 10^{-3}$ unidades Anson/ml, o con una actividad de aproximadamente 2×10^{-5} unidades a aproximadamente 4×10^{-5} unidades Anson/ml.
- 20 8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la prueba de drapeado comprende colocar una matriz tisular de un área circular conocida en la parte superior de un pedestal circular que tiene un diámetro conocido y dividir el área proyectada de la matriz tisular después de que cubre el pedestal por el área original del círculo de la matriz tisular para determinar el valor de drapeado.
9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la matriz tisular se pone en contacto con alcalasa en condiciones para producir reducciones en el valor de drapeado de o al menos el 30%,
particularmente en el que la matriz tisular se pone en contacto con alcalasa en condiciones para producir reducciones en el valor de drapeado de o al menos el 40%,
particularmente en el que la matriz tisular se pone en contacto con alcalasa bajo condiciones para producir reducciones en el valor de drapeado de o al menos el 50%,
particularmente en el que la matriz tisular se pone en contacto con alcalasa en condiciones para producir reducciones en el valor de drapeado de o al menos el 60%.
10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la matriz tisular se pone en contacto con alcalasa en condiciones para producir un valor de drapeado de 0,2-0,4.
11. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde la radiación comprende radiación de haz E, o radiación gamma.
12. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la matriz tisular se pone en contacto con alcalasa en condiciones que incluyen un tiempo de incubación en una solución que tiene una actividad de alcalasa seleccionada para producir un aumento en la porosidad.

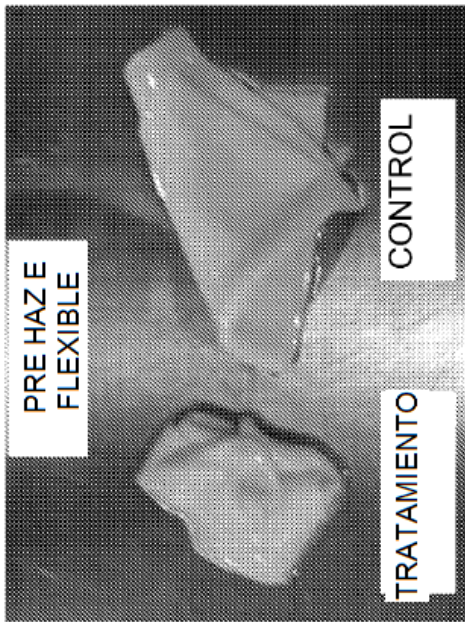


FIG. 1A



FIG. 1B

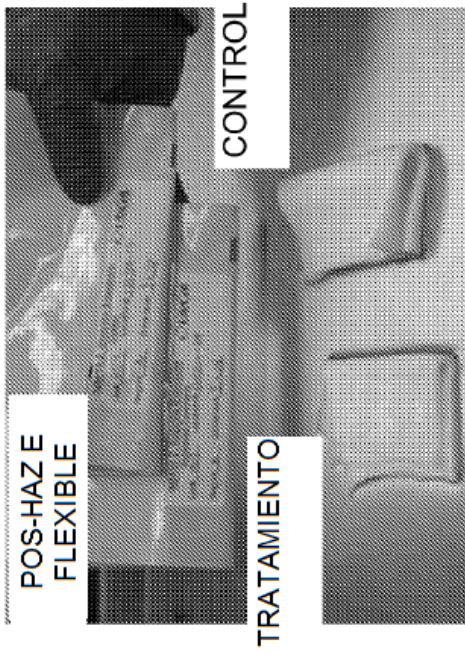


FIG. 1C

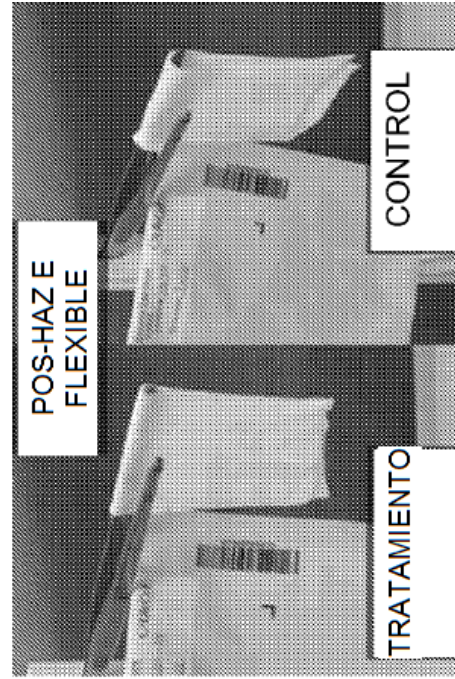


FIG. 1D

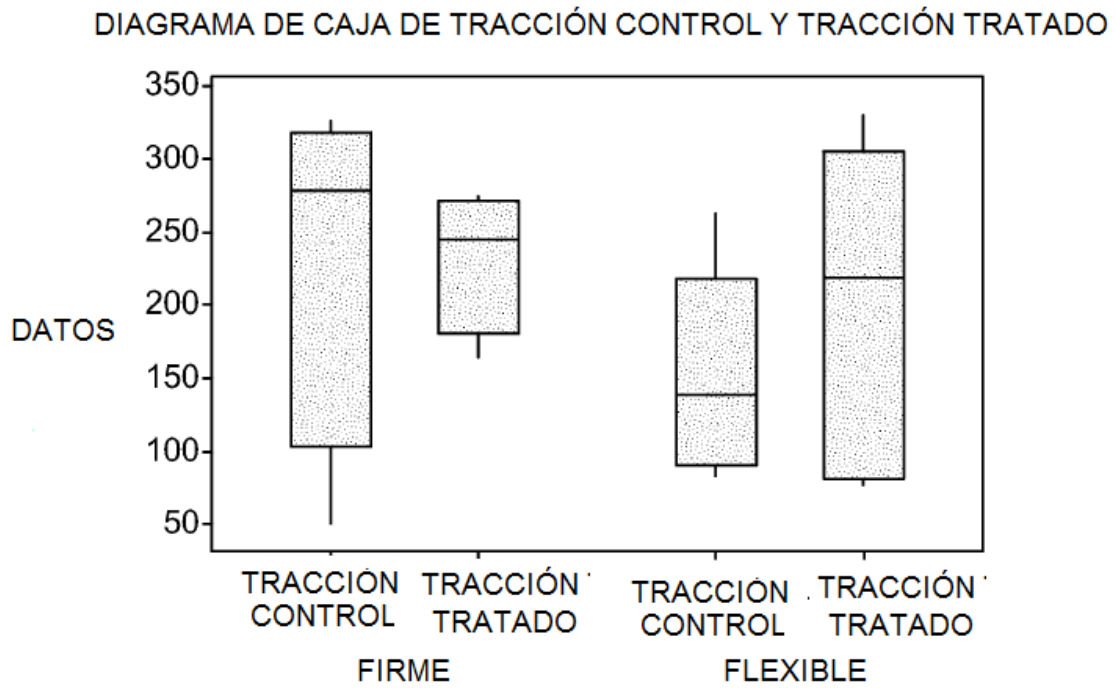


FIG. 2

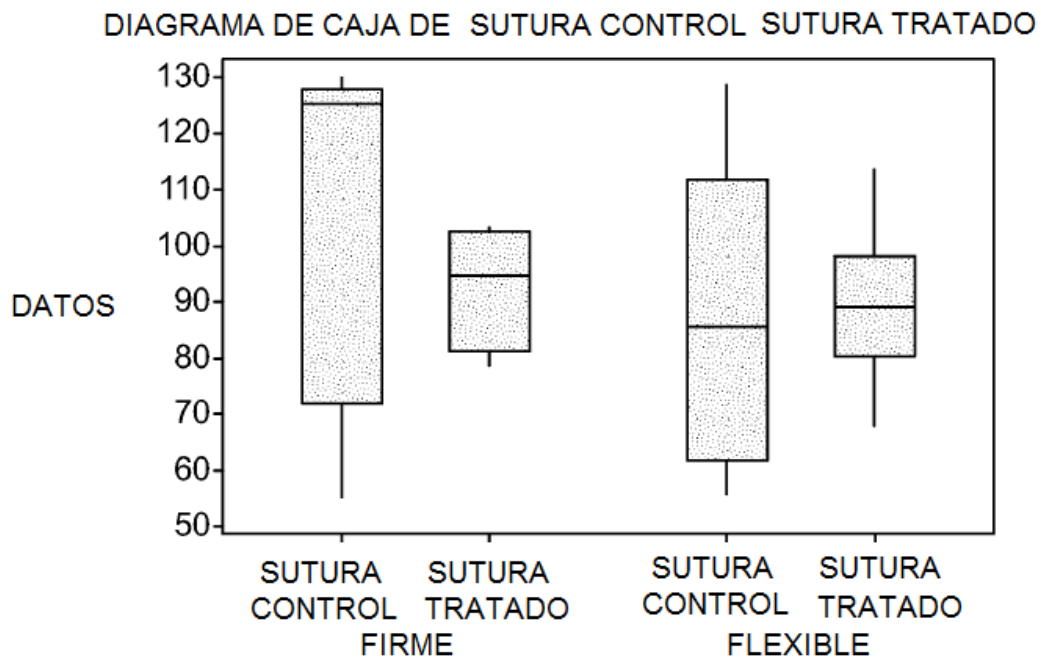


FIG. 3

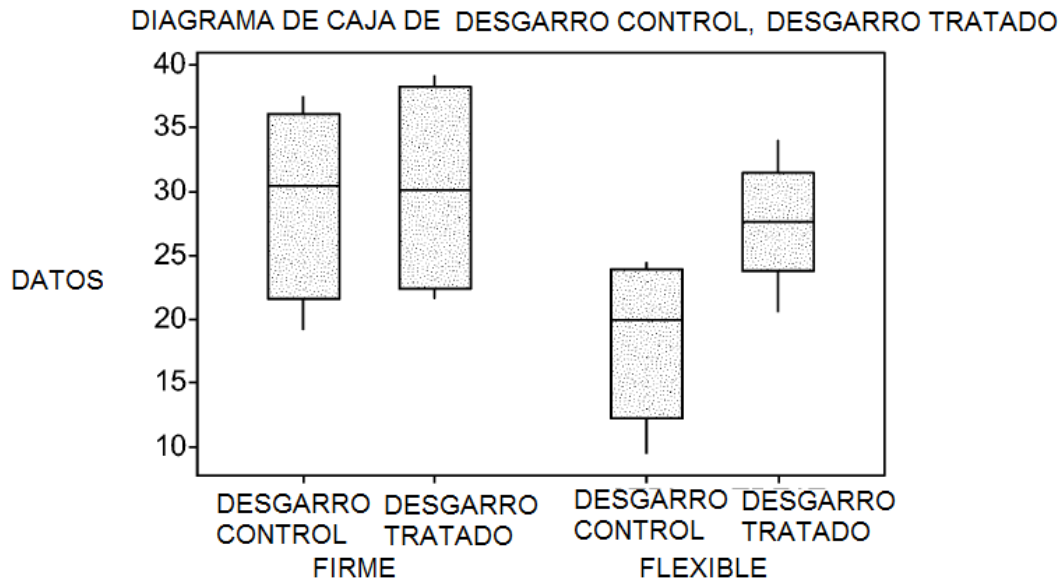


FIG. 4

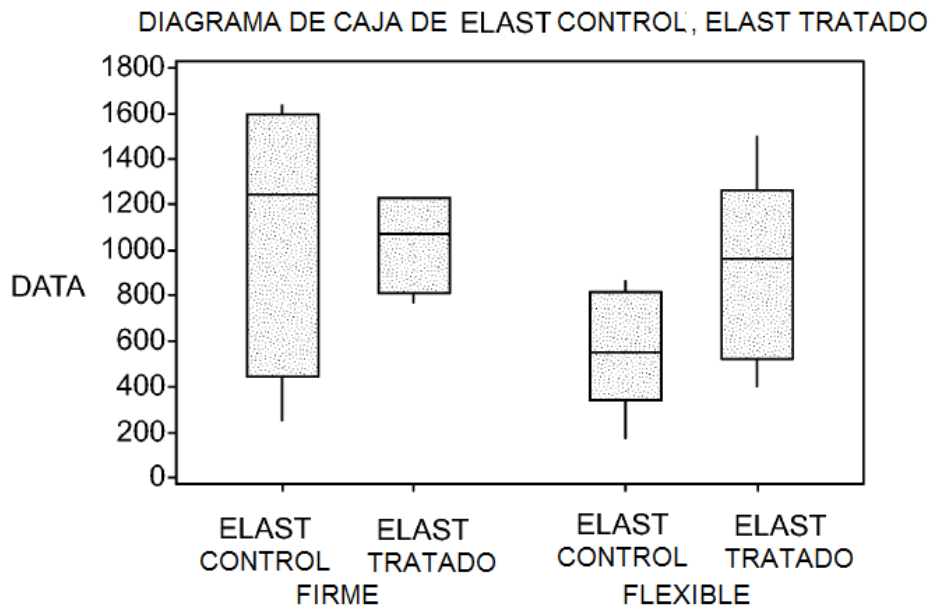


FIG. 5

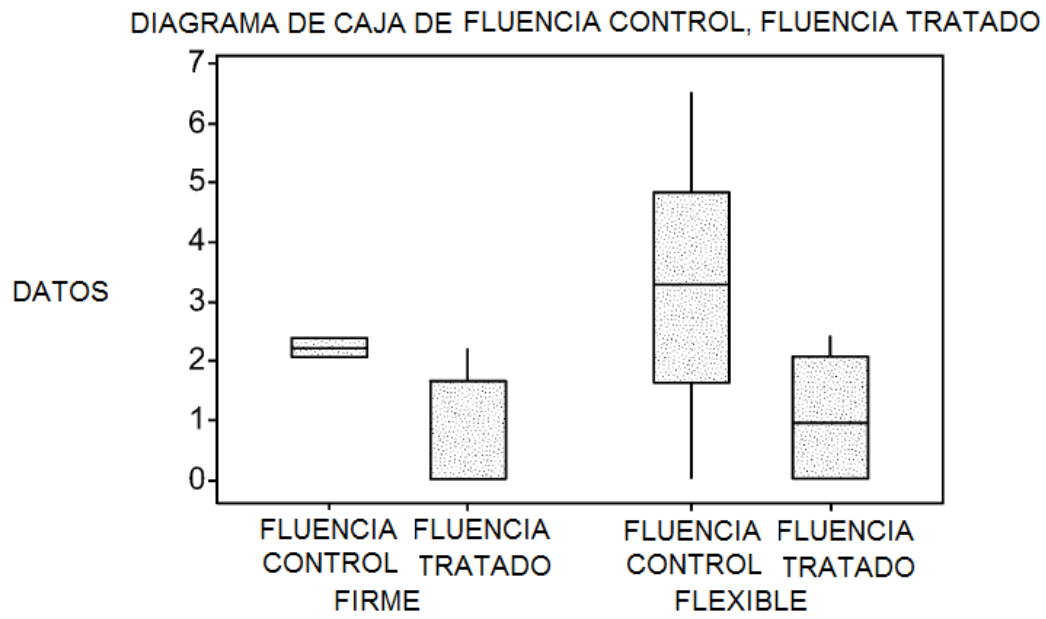
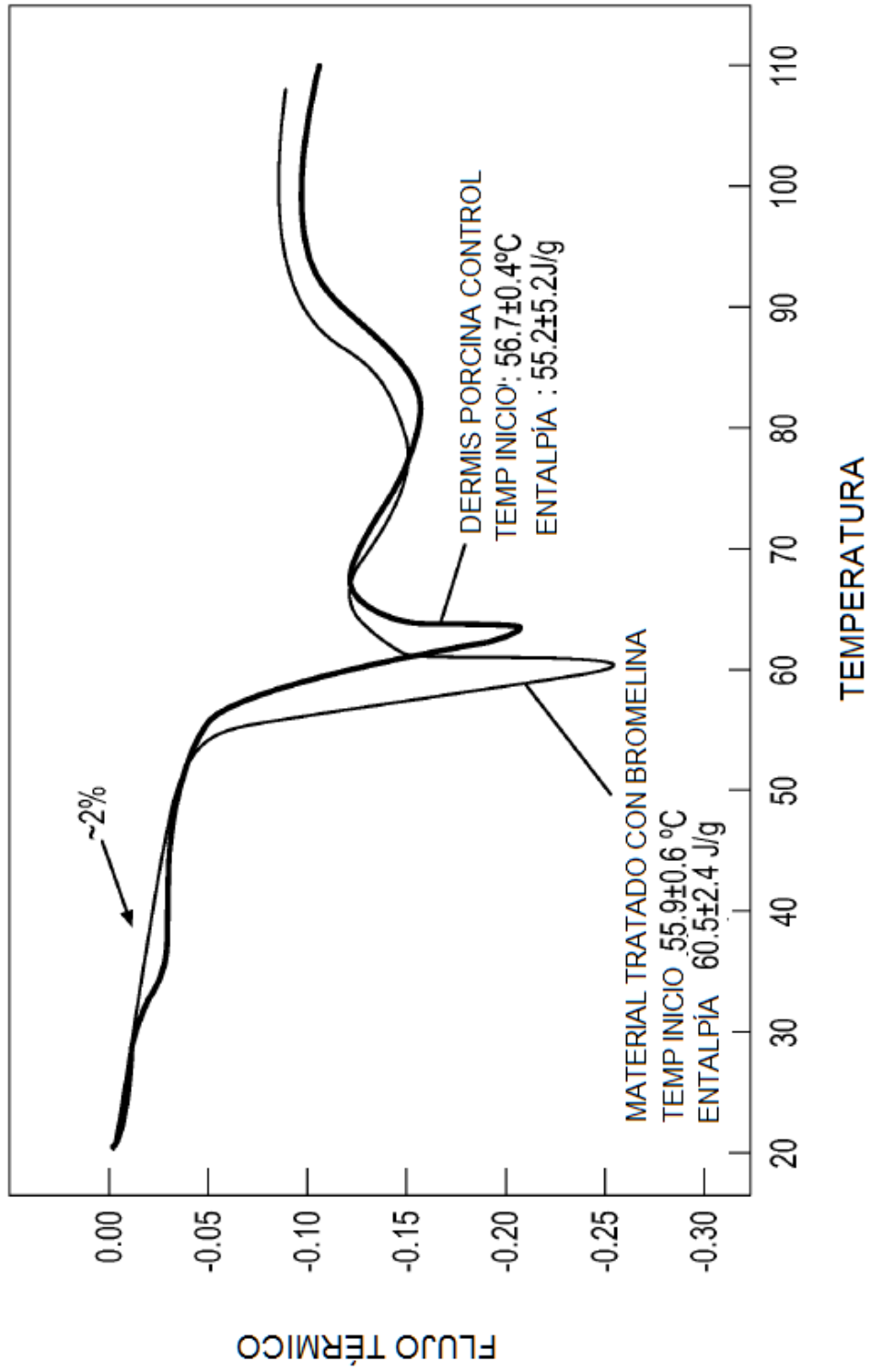


FIG. 6

**FIG. 7**

--- MONOCITOS NO INDUCIDOS
 --- LPS
 --- pADM NO TRATADO
 --- pADM TRATADO CON ENZIMA

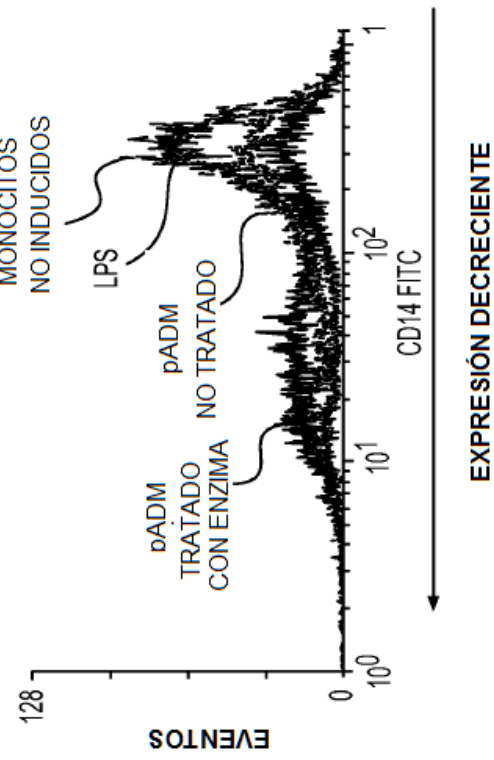


FIG. 8A

--- MONOCITOS NO INDUCIDOS
 --- LPS
 --- pADM NO TRATADO
 --- pADM TRATADO CON ENZIMA

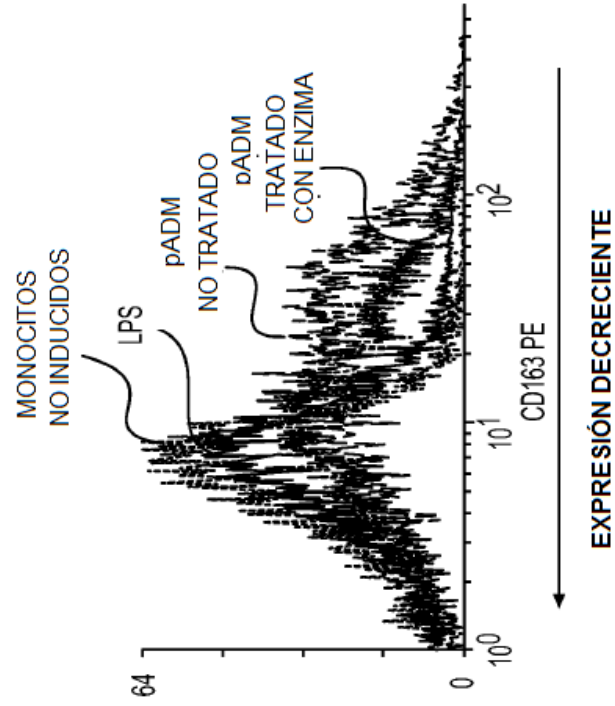


FIG. 8B

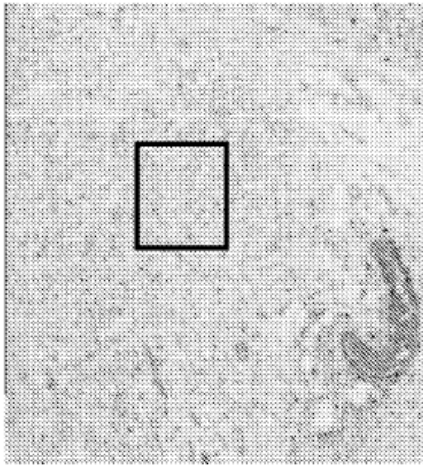


FIG. 9B

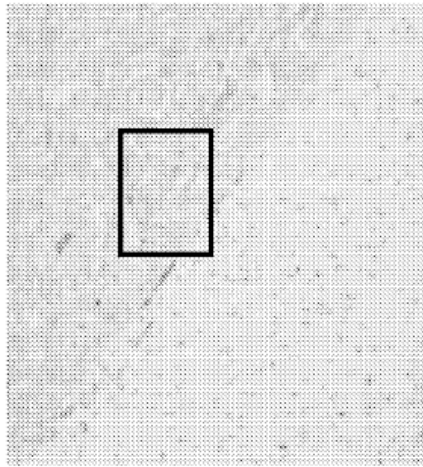


FIG. 9E

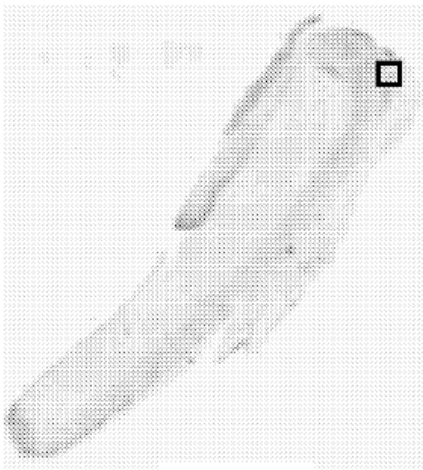


FIG. 9A

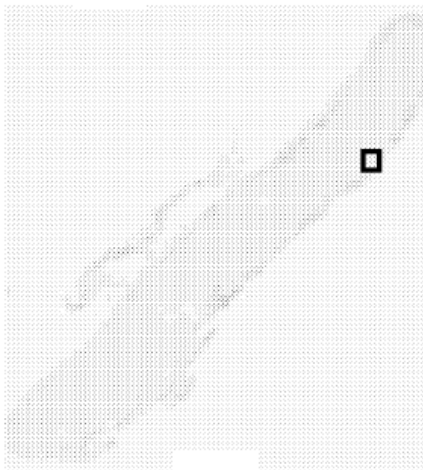


FIG. 9D

NO TRATADO
NO CONTROL

TRATADO

NO TRATADO
NO CONTROL

TRATADO

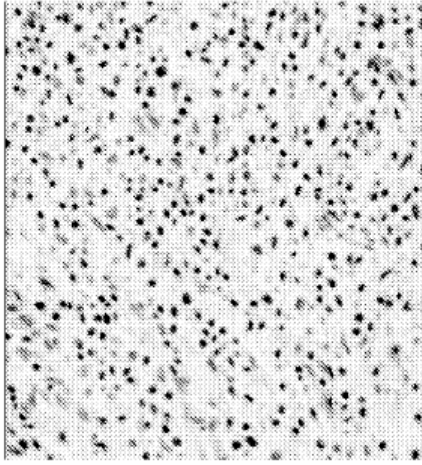


FIG. 9C

NO TRATADO
NO CONTROL

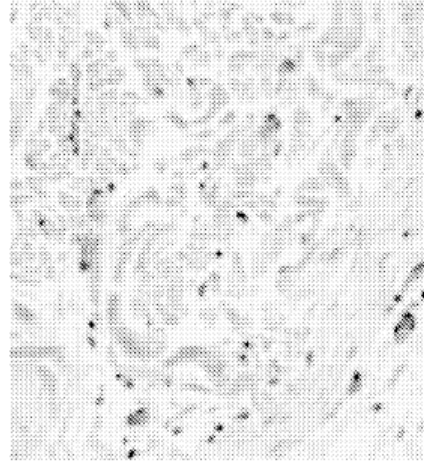
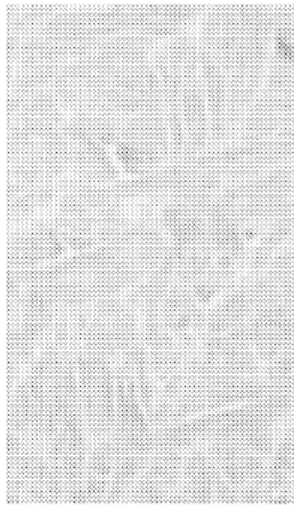


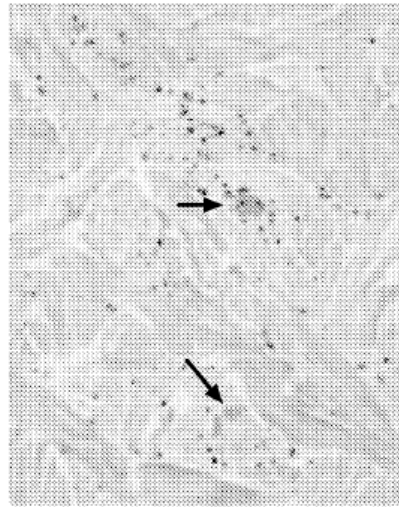
FIG. 9F

TRATADO



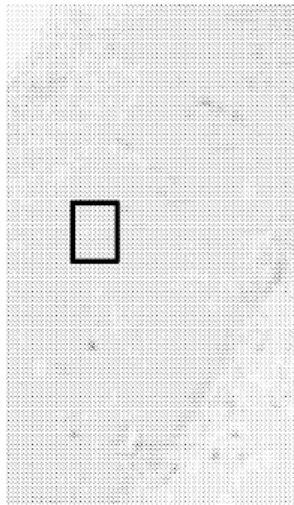
NO TRATADO
NO CONTROL

FIG. 10B



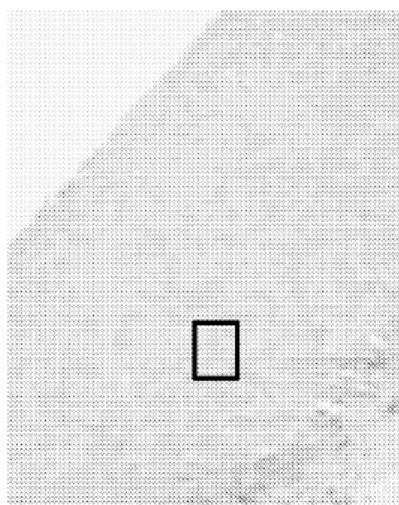
TRATADO

FIG. 10D



NO TRATADO
NO CONTROL

FIG. 10A



TRATADO

FIG. 10C

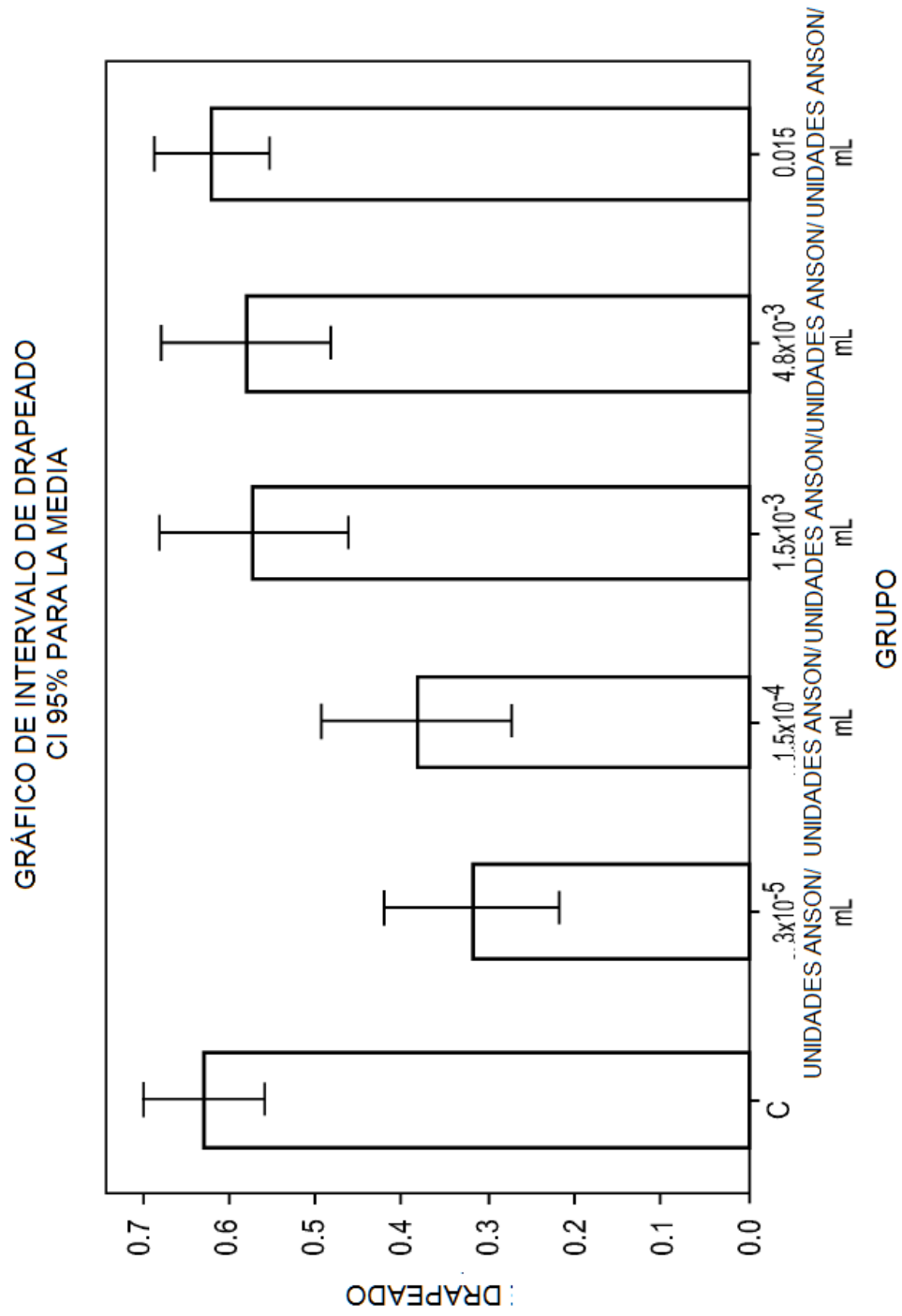


FIG. 11

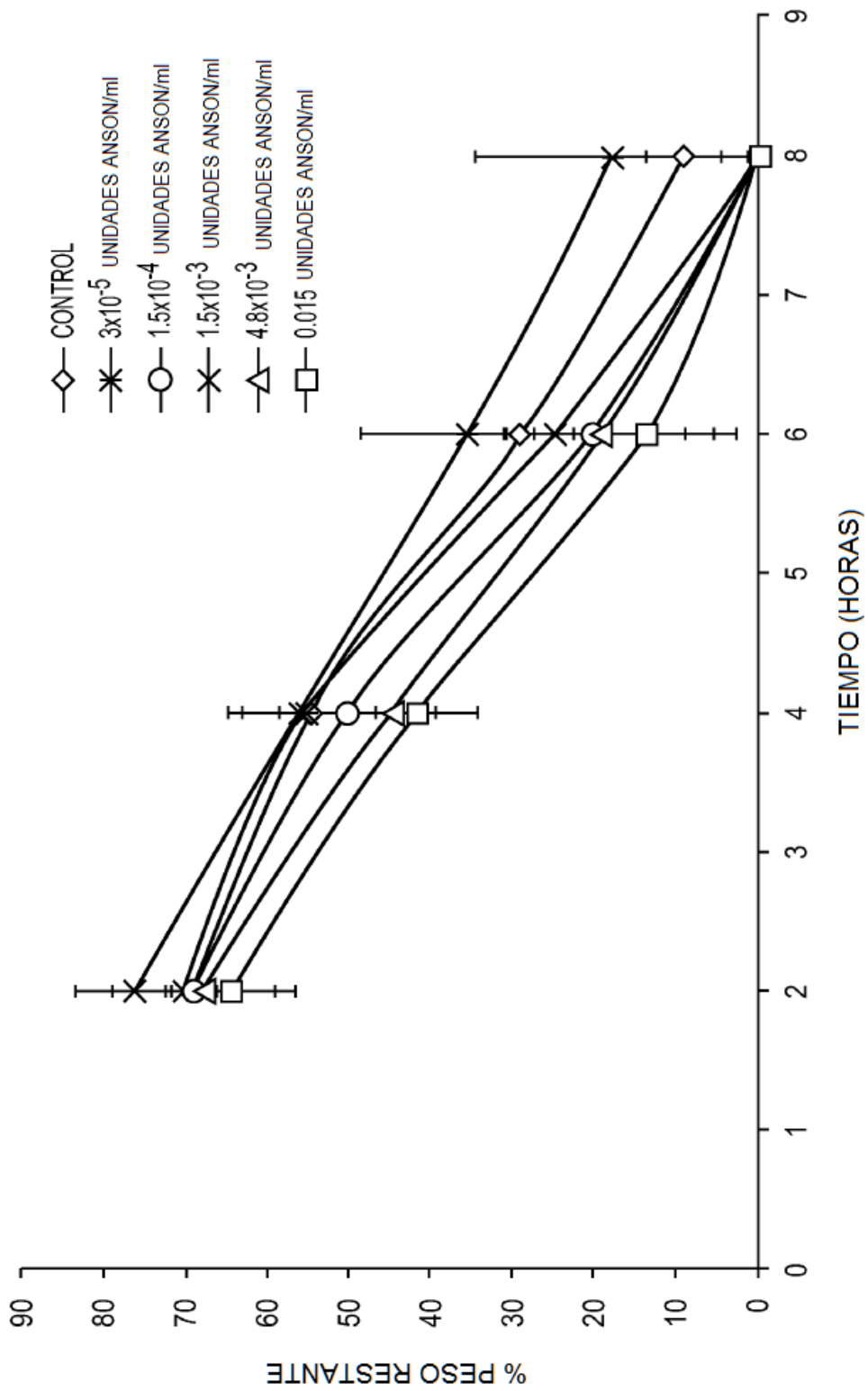
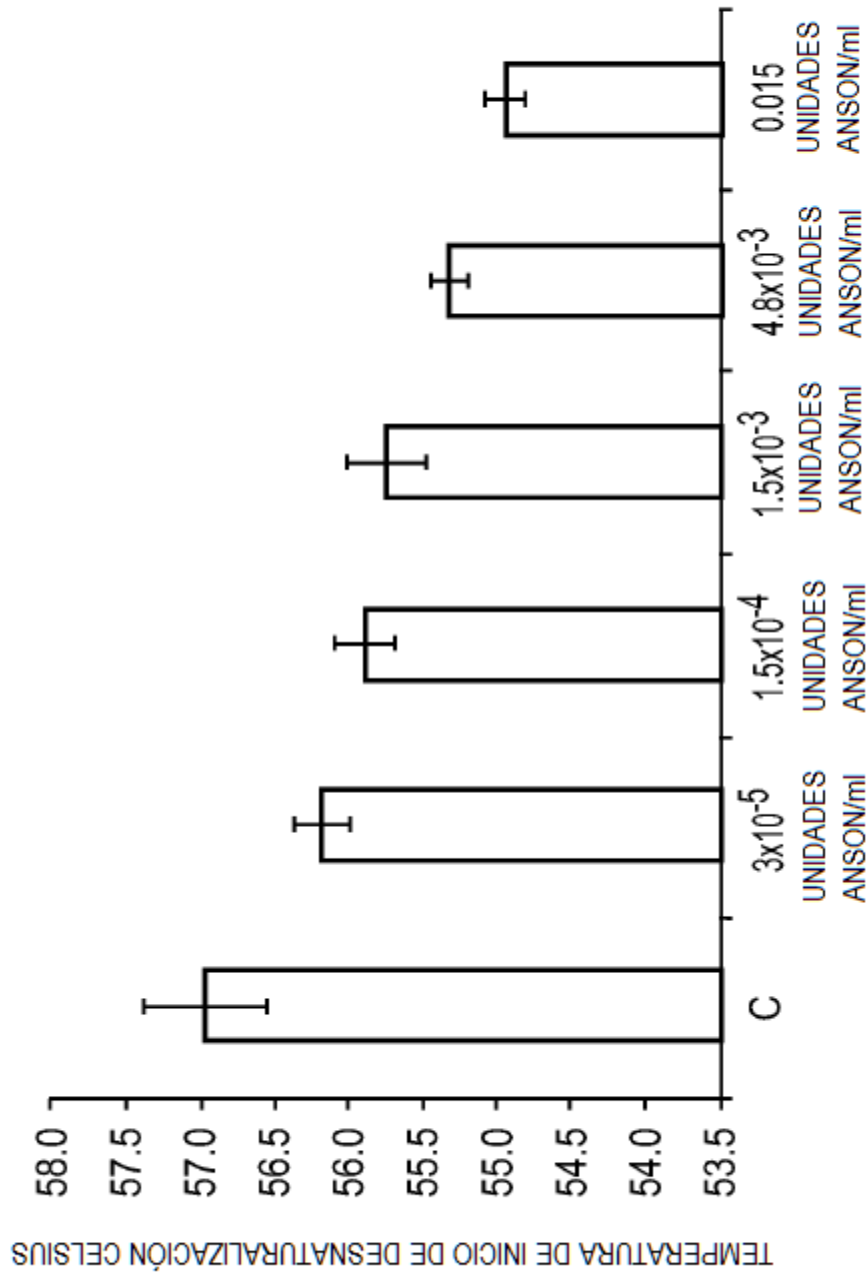


FIG. 12

**FIG. 13**

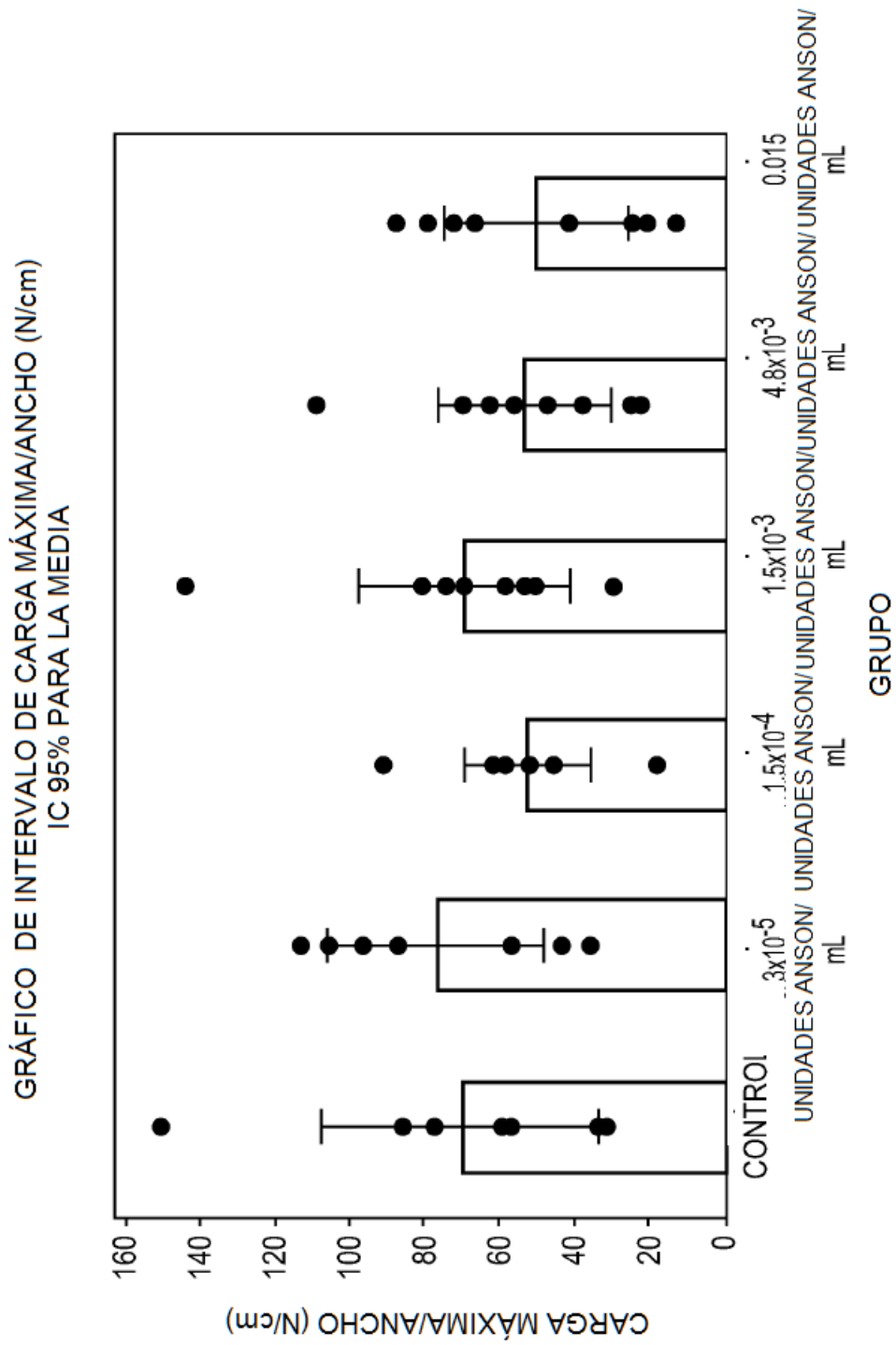


FIG. 14

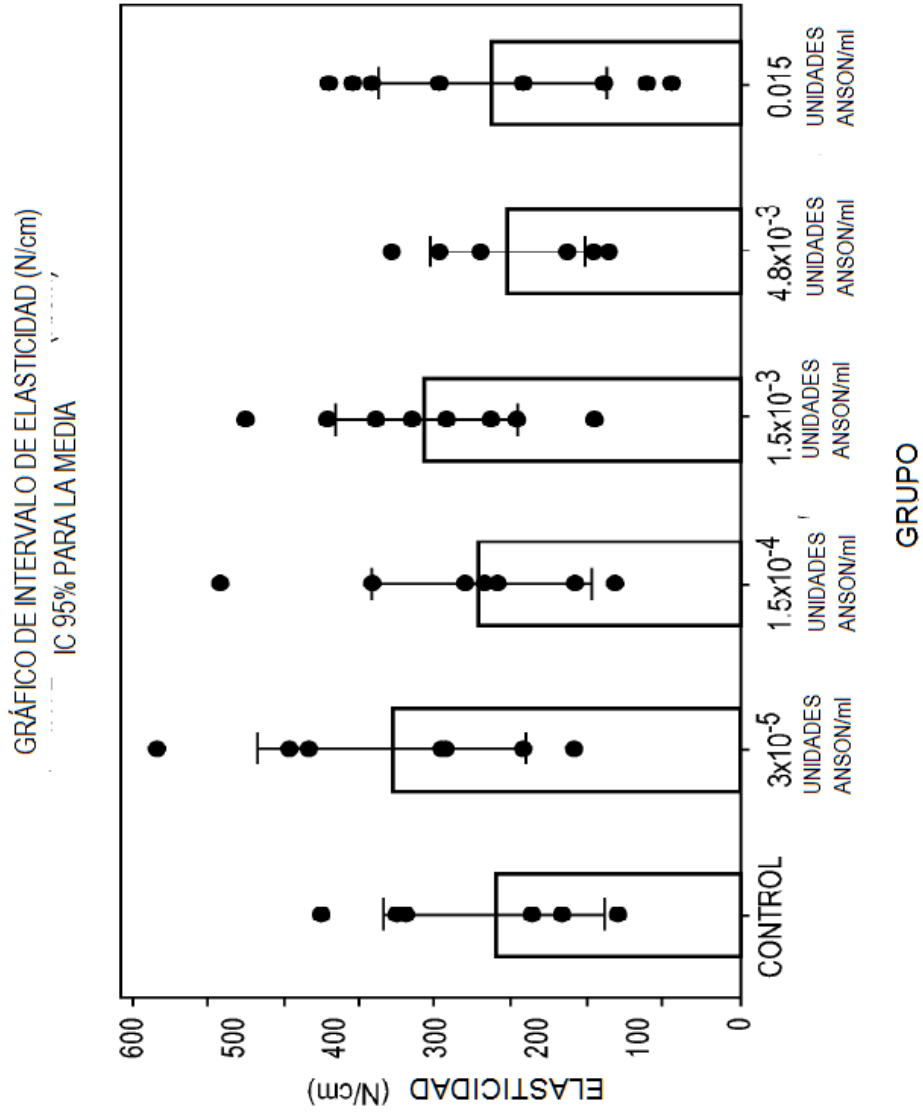


FIG. 15