

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 178**

51 Int. Cl.:

**A61L 27/36** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.04.2013 PCT/US2013/037133**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.10.2013 WO13162997**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2013 E 13719343 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2019 EP 2841115**

54 Título: **Matrices de tejido funcionalizado**

30 Prioridad:

**24.04.2012 US 201261637413 P**

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

**19.03.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**OWENS, RICK y  
LIU, ZHIGANG**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 749 178 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Matrices de tejido funcionalizado

La presente divulgación se refiere en general a procedimientos para fabricar y usar productos de tratamiento de tejidos que comprenden un entramado estructural y agentes quelantes, que pueden unirse a metales y/o proteínas de unión a metal.

Actualmente se utilizan varios productos para reparar, regenerar, sanar o tratar de otro modo tejidos y órganos enfermos o dañados. Estos productos pueden incluir injertos de tejido intactos y/o tejidos parcial o completamente descelularizados. Estos materiales proporcionan una estructura rica en colágeno en la que las células nativas de las células circundantes pueden migrar y proliferar, y de este modo promueven o mejoran la reparación, la regeneración o el tratamiento. Sin embargo, la implantación de materiales extraños, incluidos los materiales de tejidos extraños, conlleva el potencial de introducir contaminación microbiana indeseable en el sitio del implante. Además, aunque los materiales implantados pueden recubrirse con diversas sustancias bioactivas para ayudar a promover o mejorar la reparación, regeneración o tratamiento de tejidos, esas sustancias bioactivas pueden difundirse fuera del material implantado, y de este modo reducir o eliminar sus efectos beneficiosos.

<El documento US 2011/135703 divulga productos de tratamiento de tejidos. El documento US 2010/221237 divulga enzimas antibacterianas retenidas en dispositivos protésicos permanentes. El documento US 2011/044968 divulga películas en la superficie de implantes protésicos.>

La invención se define en las reivindicaciones.

En consecuencia, en el presente documento se describen productos de tratamiento de tejidos que comprenden matrices de tejido acelular y/u otros materiales sintéticos que están unidos a uno o más agentes quelantes, metales y/o proteínas de unión a metal. El producto de tratamiento de tejidos puede servir como una plataforma para la unión rápida y flexible de uno o más agentes quelantes y/o metales, como zinc o cobre, que proporcionan propiedades antimicrobianas y/o sirven como sitio de unión para una o más metaloenzimas o proteínas de unión a metal que tengan propiedades deseables. Los productos de tratamiento de tejidos que están unidos a uno o más agentes quelantes, metales y/o proteínas de unión a metal pueden implantarse en un tejido que necesite reparación, regeneración, y/o tratamiento. Por ejemplo, los productos de tratamiento de tejidos pueden ser implantados en cualquier tejido que haya sido separado por enfermedad, trauma o cirugía, o después de la extracción quirúrgica de mucho tejido, o como un implante con fines cosméticos.

En diversas realizaciones, se describe un producto de tratamiento de tejidos que comprende un material poroso que tiene una estructura natural o artificial, en la que el material poroso comprende al menos uno de los siguientes materiales: una matriz extracelular de un tejido parcialmente descelularizado, y una matriz extracelular de un tejido completamente descelularizado y en el que al menos un agente quelante está unido covalentemente al material poroso. En algunas realizaciones, el producto de tratamiento de tejidos comprende al menos uno de algún derivado de ácido hialurónico, quitosano, policaprolactona, poliglicólido, polilactida, polidioxano, un éster poliéter, poli-(lactida-co-glicólido) y/o polihidroxialconato. En otras realizaciones, el producto de tratamiento de tejidos comprende la matriz extracelular de un tejido parcial o completamente descelularizado seleccionado de al menos un tejido de seres humanos, primates no humanos, cerdos, vacas, caballos, cabras, ovejas, perros, gatos, conejos, cobayas, jerbos, hámster, rata y ratón, o de al menos un tejido de hueso, piel, dermis, intestino, vascular, vejiga urinaria, tendón, ligamento, músculo, fascia, tejido neurológico, vaso, hígado, corazón, pulmón, riñón y tejido cartilaginosa.

En ciertas realizaciones, el producto de tratamiento de tejidos comprende además una o más células viables, como células de mamífero (por ejemplo, células madre). En algunas realizaciones, el producto de tratamiento de tejidos comprende además al menos un factor seleccionado de un agente antiinflamatorio, un analgésico, un factor de crecimiento celular, un factor angiogénico, un factor de diferenciación, una citocina, una hormona y una quimiocina.

En diversas realizaciones, al menos un agente quelante se une covalentemente a grupos amina, tiol o hidroxilo libres en el material poroso en el producto de tratamiento de tejidos. En ciertas realizaciones, el al menos un agente quelante es al menos uno de ácido iminodiacético (IDA), ácido nitrilotriacético (NTA), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y/o ácido dietilentriaminopentaacético (DT-PA). En algunas realizaciones, el agente quelante se une covalentemente al material poroso en el producto de tratamiento de tejidos a través de un agente de activación (por ejemplo, N-hidroxisulfosuccinimida (NHS), Ácido subérico bis (éster de N-hidroxisuccinimida), 1,4-butanodiol diglicidil éter, epibromohidrina y/o 1,2,7,8-diepoxioctano).

En diversas realizaciones, un producto de tratamiento de tejidos se funcionaliza con al menos un metal que está unido al al menos un agente quelante en el producto de tratamiento de tejidos. En algunas realizaciones, el al menos un metal comprende al menos uno de calcio, zinc, cobre, plata, cobalto, níquel, manganeso y/o magnesio. En ciertas realizaciones, el al menos un metal tiene propiedades antimicrobianas y/o la capacidad de interactuar con al menos una proteína de unión a metal.

En diversas realizaciones, un producto de tratamiento de tejidos se funcionaliza con al menos un metal y/o al menos una proteína de unión a metal que se une al metal en el producto de tratamiento de tejidos. En algunas realizaciones, la al menos una proteína de unión a metal tiene propiedades antimicrobianas (por ejemplo, lisostafina). En algunas realizaciones, la al menos una proteína de unión a metal comprende al menos una metaloproteína de matriz, como, por ejemplo, una colagenasa, gelatinasa, estromolisina, matrilisina y/o elastasa.

En diversas realizaciones, se proporciona un kit que comprende un producto de tratamiento de tejidos, como se describe en el presente documento, e instrucciones para usar el kit. En algunas realizaciones, el kit se empaqueta en condiciones asépticas o estériles.

5 En diversas realizaciones, se proporciona un procedimiento para fabricar un producto de tratamiento de tejidos, que comprende la selección de un material poroso que cuenta con una estructura natural o artificial en la que el material comprende al menos uno de los siguientes materiales: una matriz extracelular de un tejido parcialmente descelularizado, y una matriz extracelular de un tejido completamente descelularizado y que une covalentemente al menos un agente quelante al material poroso. En algunas realizaciones, unir covalentemente al menos un agente quelante al material poroso comprende primero hacer reaccionar el agente quelante con un agente de activación (como, por ejemplo, N-hidroxisulfosuccinimida (NHS), ácido subérico bis (éster de N-hidroxisuccinimida), 1,4-butanodiol diglicidil éter, epibromohidrina y/o 1,2,7,8-diepoxiocetano) y posteriormente unir covalentemente el agente quelante activado a grupos amina, tiol o hidroxilo libres en el material poroso. En algunas realizaciones, el al menos un agente quelante comprende al menos uno de IDA, NTA, EDTA y/o DTPA.

15 En diversas realizaciones, un procedimiento para fabricar un producto de tratamiento de tejidos comprende además funcionalizar el producto de tratamiento de tejidos al poner en contacto el producto de tratamiento de tejidos con al menos un metal (por ejemplo, calcio, zinc, cobre, plata, cobalto, manganeso, níquel y/o magnesio) que puede unirse al uno o más agentes quelantes en el producto de tratamiento de tejidos. En ciertas realizaciones, el al menos un metal tiene propiedades antimicrobianas y/o la capacidad de interactuar con al menos una proteína de unión a metal.

20 En diversas realizaciones, un procedimiento para fabricar un producto de tratamiento de tejidos comprende además poner en contacto el producto de tratamiento de tejidos funcionalizado con al menos una proteína de unión a metal. En algunas realizaciones, la al menos una proteína de unión a metal tiene propiedades antimicrobianas (por ejemplo, lisostafina). En algunas realizaciones, la al menos una proteína de unión a metal comprende al menos una metaloproteínasa de matriz como, por ejemplo, una colagenasa, gelatinasa, estromolisina, matrilisina y/o elastasa.

25 En algunas realizaciones, un procedimiento para fabricar un producto de tratamiento de tejidos comprende además irradiar el producto de tratamiento de tejidos, por ejemplo, con irradiación 15-25 kGy E-beam.

30 En diversas realizaciones, se proporciona un procedimiento de tratamiento que comprende implantar un producto de tratamiento de tejidos en un tejido que necesita ser reparado, regenerado, cicatrizado, tratado y/o alterado. En algunas realizaciones, el producto de tratamiento de tejidos implantado proporciona un entramado estructural en el que las células nativas del tejido circundante pueden migrar y proliferar, y de este modo promueven o mejoran la reparación, regeneración, cicatrización, tratamiento y/o alteración del tejido. En ciertas realizaciones, el (los) agente(s) quelante(s) en un producto de tratamiento de tejidos puede(n) unir y aislar al menos un metal no deseado en el sitio de la implantación. En ciertas realizaciones, el producto de tratamiento de tejidos implantado es funcionalizado con al menos un metal y tiene un nivel más bajo de carga biológica, en comparación con un producto de tratamiento de tejidos implantado que no es funcionalizado con metal, en cualquier momento después de la implantación en un tejido huésped. En algunas realizaciones, el producto de tratamiento de tejidos implantado es funcionalizado con al menos un metal y al menos una proteína de unión a metal, y el producto de tratamiento de tejidos implantado tiene un nivel más bajo de carga biológica, en comparación con un producto de tratamiento de tejidos implantado que no es funcionalizado con la proteína de unión a metal, en cualquier momento después de la implantación en un tejido huésped. En ciertas realizaciones, el producto de tratamiento de tejidos implantado es funcionalizado con al menos un metal y al menos una metaloproteínasa de matriz, y la metaloproteínasa de matriz promueve y/o mejora la proliferación, migración, diferenciación y/o angiogénesis de células nativas, y/o reduce la inflamación en el sitio de la implantación, en comparación con un producto de tratamiento de tejidos implantado que no es funcionalizado con una metaloproteínasa de matriz.

45 En algunas realizaciones, un producto de tratamiento de tejidos se implanta con fines cosméticos, por ejemplo, para usarse en combinación con un implante mamario. En otras realizaciones, se implanta un producto de tratamiento de tejidos después de la extracción de tejido nativo, por ejemplo, después de la extracción de un tumor. En otras realizaciones, se implanta un producto de tratamiento de tejidos después de la separación quirúrgica de tejidos nativos o en una herida u otro espacio vacío que se produce a través de una lesión o de una enfermedad. En algunas realizaciones, la implantación de un producto de tratamiento de tejidos produce una cicatrización más rápida, en comparación con la cicatrización en ausencia de un producto de tratamiento de tejidos implantado.

50 En diversas realizaciones, se proporciona un Procedimiento de tratamiento, que comprende el uso de un producto de tratamiento de tejidos que tiene un material sintético poroso y al menos un agente quelante que se une covalentemente al material poroso. En algunas realizaciones, el producto de tratamiento de tejidos que tiene un material sintético poroso se usa para sellar la superficie de una herida o incisión quirúrgica, y el producto de tratamiento de tejidos proporciona una plataforma para la fijación rápida de metales y/o proteínas de unión a metal antes de uso quirúrgico en un sujeto. En ciertas realizaciones, el producto de tratamiento de tejidos es funcionalizado con al menos un metal y/o al menos una proteína de unión a metal. En algunas realizaciones, el uso del producto de tratamiento de tejidos da como resultado un punto de herida o incisión quirúrgica que tiene un nivel más bajo de carga biológica, en comparación con un sitio de herida o incisión quirúrgica que no se pone en contacto con un producto de tratamiento de tejido.

## 60 Descripción de los dibujos

La Fig. 1A muestra procedimientos, de acuerdo con ciertas realizaciones de la presente divulgación, para preparar ácido iminodiacético activado (IDA) al hacer reaccionar IDA con N-hidroxisulfosuccinimida (NHS) para formar un derivado IDA-

NHS, o al hacer reaccionar IDA con epibromohidrina o 1, 2,7,8-diepoxi octano para formar derivados de epóxido de IDA. En la figura, DMSO se refiere a dimetilsulfóxido, TMSCl se refiere a cloruro de trimetilsililo, DIEA se refiere a N, N-Diisopropiletilamina, MeCN se refiere a acetonitrilo y HCl es cloruro de hidrógeno.

5 La Fig. 1B muestra un procedimiento, de acuerdo con ciertas realizaciones, para funcionalizar un producto de tratamiento de tejidos a través de la unión de zinc y lisostafina a un agente quelante en un producto de tratamiento de tejidos. La barra vertical en la figura representa el producto de tratamiento de tejidos, mientras que los objetos marcados como "1" "2" y "3" representan un reticulante, Zn<sup>2+</sup> y lisostafina.

10 La Fig. 2 muestra las unidades formadoras de colonias bacterianas (UFC) en función de la concentración (µg/ml) de lisostafina en solución salina recubierta con muestras dérmicas porcinas acelulares después de una incubación durante la noche con aproximadamente 1E<sup>6</sup> S. aureus a 37°C.

15 La Fig. 3 muestra la concentración bacteriana (UFC, graficada a una escala logarítmica) después de una incubación durante la noche con aproximadamente 1E<sup>6</sup> S. aureus a 37°C para matrices de tejidos funcionalizadas solo con IDA, solo con zinc, o con IDA y zinc, así como para muestras de control y para muestras de inóculo. Las medidas de CFU se muestran para matrices de tejidos inoculadas con S. aureus después de la funcionalización, así como para matrices de tejidos inoculadas con S. aureus después de la funcionalización y un lavado durante la noche en solución salina.

**Descripción de ciertas realizaciones ejemplares**

Ahora se hará referencia en detalle a ciertas realizaciones ejemplares de acuerdo con la presente divulgación, ciertos ejemplos de las mismas se ilustran en los dibujos adjuntos.

20 En diversas realizaciones, se prevén productos de tratamiento de tejidos. En algunas realizaciones, un producto de tratamiento de tejidos comprende la matriz extracelular de un tejido humano o animal descelularizado parcial o completamente. En otras realizaciones, un producto de tratamiento de tejidos comprende un material sintético que contiene un entramado estructural en el que las células nativas pueden migrar desde el tejido que rodea un producto de tratamiento de tejidos implantado y proliferar, y de este modo promueven la reparación, regeneración y/o tratamiento de tejidos. En algunas realizaciones, un producto de tratamiento de tejidos comprende al menos un tejido humano o animal descelularizado parcial o completamente y al menos un material sintético que contiene un entramado estructural.

25 En ciertas realizaciones, un producto de tratamiento de tejidos puede unirse a al menos un agente quelante. Los agentes quelantes en el producto de tratamiento de tejidos pueden usarse para aislar metales indeseables o dañinos en el sitio de implantación. Alternativamente, en ciertas realizaciones, el producto de tratamiento de tejidos puede proporcionar una plataforma flexible para la adición de una variedad de reactivos funcionales adicionales. Por ejemplo, el uno o más agentes quelantes en un producto de tratamiento de tejidos pueden usarse para inmovilizar uno o más metales, y de este modo se producen productos de tratamiento de tejidos funcionalizados. Los metales pueden seleccionarse, en ciertas realizaciones, por sus propiedades antimicrobianas, por ejemplo, su capacidad para reducir o prevenir el crecimiento de microorganismos en un producto de tratamiento de tejidos después de la implantación en un tejido receptor. Por ejemplo, el metal unido al producto de tratamiento de tejidos puede ser plata, un metal que puede inhibir el crecimiento en un producto de tratamiento de tejidos implantado de microorganismos del entorno del huésped. Además, en algunas realizaciones, la inmovilización del metal antimicrobiano en el producto de tratamiento de tejidos a través de un agente quelante reduce la cantidad de metal que se filtrará del producto de tratamiento de tejidos. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, puede lograrse una concentración local más alta de metal antimicrobiano en el sitio de la implantación al usarse una concentración general más baja.

30 En ciertas realizaciones, el al menos un metal unido a un producto de tratamiento de tejidos puede usarse para inmovilizar al menos una metaloenzima u otra proteína de unión a metales en el producto. El metal puede ser cualquier metal (por ejemplo, calcio, zinc, cobre, cobalto, níquel, manganeso o magnesio) adecuado para unirse a una metaloenzima deseada o a otra proteína de unión a metal. La metaloenzima o la proteína de unión a metal puede seleccionarse para proporcionar cualquier propiedad beneficiosa deseada después de la implantación en un tejido que lo necesite. Por ejemplo, la metaloenzima puede ser lisostafina, una peptidasa que se une al zinc y puede usarse para reducir la carga biológica en un producto de tratamiento de tejidos. En otro ejemplo, un producto de tratamiento de tejidos puede funcionalizarse con una o más metaloproteinasas de matriz, que son importantes para la regulación de la proliferación celular, la migración celular, la diferenciación celular, la angiogénesis y la inflamación.

35 Los productos de tratamiento de tejidos descritos en este documento pueden usarse, en diversas realizaciones, para reparar, regenerar, curar, tratar y/o alterar un tejido que lo necesite. Por ejemplo, un producto de tratamiento de tejidos implantado puede proporcionar una estructura biológica o sintética en la que las células nativas del tejido que rodea un producto de tratamiento de tejidos implantado pueden migrar y proliferar. Además, en ciertas realizaciones, el producto de tratamiento de tejidos puede tener también propiedades antimicrobianas, y de este modo se reduce o se evita un aumento de la carga biológica en un producto de tratamiento de tejidos después de la implantación en un tejido huésped. De manera similar, en algunas realizaciones, el producto de tratamiento de tejidos puede usarse para suministrar enzimas, moléculas de señalización u otros factores al tejido que necesite reparación, regeneración o tratamiento, y de este modo promueven o mejoran la repoblación y/o revascularización del producto de tratamiento de tejidos con células nativas del tejido circundante.

40 Los materiales y procedimientos proporcionados en el presente documento pueden usarse para fabricar una composición biocompatible. Como se usa en el presente documento, una composición "biocompatible" es aquella que

tiene la capacidad de soportar la migración y proliferación de células nativas del tejido circundante en un producto de tratamiento de tejidos implantado. Las composiciones biocompatibles le dan soporte a la actividad celular nativa necesaria para la regeneración, reparación, cicatrización o tratamiento de los tejidos y no provocan una respuesta inmune sustancial que impida esta actividad celular. Como se usa en el presente documento, una "respuesta inmune sustancial" es aquella que impide la regeneración, reparación, cicatrización o tratamiento parcial o total del tejido.

Como se usa en el presente documento, los términos "células nativas" y "tejido nativo" se refieren a las células o el tejido presente en el órgano o tejido receptor antes de la implantación de un producto de tratamiento de tejidos, o las células o el tejido producido por el animal huésped después de la implantación.

Los encabezados de sección utilizados en el presente documento son solo para fines organizativos y no deben interpretarse como limitantes del tema descrito.

En esta aplicación, el uso del singular incluye el plural a menos que se indique específicamente lo contrario. También en esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario. Además, el uso del término "incluir", así como otras formas, como, por ejemplo, "incluye" e "incluido", no son limitantes. Se entenderá que cualquier rango descrito en el presente documento incluye los puntos finales y todos los valores entre los puntos finales.

### **Productos de tratamiento de tejidos**

En diversas realizaciones, un producto de tratamiento de tejidos comprende tejido humano o animal que se ha descelularizado al menos parcialmente. El tejido puede ser tejido acelular, parcialmente descelularizado y/o descelularizado que ha sido repoblado con células exógenas, siempre que el tejido retenga al menos parte de la matriz extracelular encontrada en el tejido antes de la descelularización.

En ciertas realizaciones, el producto de tratamiento de tejidos puede comprender un material sintético que tenga una estructura artificial que se aproxime a la estructura de la matriz extracelular de un tejido humano o animal. Por ejemplo, el producto de tratamiento de tejidos puede comprender una estructura derivada de un derivado de ácido hialurónico, quitosano, policaprolactona, poliglicólido, polilactida, polidioxano (u otros ésteres de poliéter), poli-(lactida-co-glicólido) y/o polihidroxialconato. En algunas realizaciones, un producto de tratamiento de tejidos comprende una combinación de al menos un material sintético y al menos un material de tejido animal o humano, o puede comprender uno o más materiales sintéticos solos, o uno o más materiales de tejidos animales o humanos solos. Por ejemplo, el producto de tratamiento de tejidos puede comprender una estructura derivada del ácido hialurónico y la matriz acelular de un tejido descelularizado.

En algunas realizaciones, un producto de tratamiento de tejidos puede comprender un material artificial para uso en la reparación o el tratamiento de heridas. El producto puede prever un material para sellar una herida al mismo tiempo que sirve como plataforma para el suministro de diversos agentes quelantes, metales y/o proteínas de unión a metal, como se describe con más detalle a continuación. Por ejemplo, el producto de tratamiento de tejidos para su uso en la reparación o el tratamiento de heridas puede comprender una espuma de poliuretano, como, por ejemplo, V.A.C. GRANUFOAM (KCI, Inc., San Antonio, TX), solo o en combinación con un tejido parcial o completamente descelularizado.

En ciertas realizaciones, un producto de tratamiento de tejidos puede derivar de cualquier tejido humano o animal que sea adecuado para la descelularización parcial o completa y la posterior implantación. Los tejidos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, hueso, piel, dermis, intestino, vejiga urinaria, tendón, ligamento, músculo, fascia, tejido neurológico, vaso, hígado, corazón, pulmón, riñón, cartílago y/o cualquier otro tejido adecuado. En ciertas realizaciones, el producto de tratamiento de tejidos puede incluir un tejido blando de mamífero. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el producto de tratamiento de tejidos puede incluir dermis de mamífero parcial o completamente descelularizada. En otras realizaciones, el producto de tratamiento de tejidos puede comprender submucosa del intestino delgado parcial o completamente descelularizada, o tejido pulmonar o hepático parcial o completamente descelularizado. En ciertas realizaciones, el tejido descelularizado puede provenir de fuentes humanas o no humanas. Ejemplos de fuentes de tejido no humano adecuadas incluyen, pero no se limitan a, cerdos, ovejas, cabras, conejos, monos y/u otros mamíferos no humanos.

En algunas realizaciones, los productos de tratamiento de tejidos pueden formarse a partir de ALLODERM® o STRATTICE™ (Lifecell Corp., Branchburg, NJ), que son matrices dérmicas acelulares humanas y porcinas, respectivamente. Alternativamente, puede usarse cualquier otra matriz adecuada de tejido acelular. Por ejemplo, en Badylak et al. se describe una serie de materiales de estructura biológica, y los procedimientos de la presente divulgación pueden usarse para producir una matriz de tejido acelular tridimensional estable al usarse cualquiera de estos materiales, o cualquier otro material similar. Badylak et al., "Matriz extracelular como material un entramado biológico: estructura y función", Acta Biomaterialia (2008), doi: 10.1016/j.actbio.2008.09.013.

En diversas realizaciones, la estructura extracelular dentro de una matriz de tejido acelular o parcialmente descelularizado puede consistir en colágeno, elastina u otras fibras, así como proteoglicanos, polisacáridos y factores de crecimiento. La matriz de tejido puede retener algunos o todos los componentes de la matriz extracelular que se encuentran naturalmente en un tejido antes de la descelularización, o varios componentes indeseables pueden eliminarse a través de medios químicos, enzimáticos o genéticos. En general, la matriz acelular proporciona una red estructural de fibras, proteoglicanos, polisacáridos y factores de crecimiento en los que el tejido y la vasculatura nativos pueden migrar, crecer y proliferar. Los componentes estructurales exactos de la matriz extracelular dependerán del tejido

seleccionado y de los procesos utilizados para preparar el tejido acelular o parcialmente descelularizado.

En ciertas realizaciones, un producto de tratamiento de tejidos carece de ciertos antígenos indeseables. Por ejemplo, ciertos tejidos animales contienen epítomos de alfa-galactosa ( $\alpha$ -gal) que se conoce que provocan reacciones en humanos. Por lo tanto, los productos de tratamiento de tejidos acelulares derivados de diversos tejidos animales pueden ser producidos o procesados para carecer de ciertos antígenos, como, por ejemplo,  $\alpha$ -gal. En algunas realizaciones, los productos de tratamiento de tejidos carecen sustancialmente de cualquier resto de  $\alpha$ -gal. La eliminación de los epítomos de  $\alpha$ -gal de un producto de tratamiento de tejidos puede disminuir la respuesta inmune contra la composición. U. Galili y col., J. Quim. Biol. 263: 17755 (1988). Dado que los mamíferos no primates (por ejemplo, los cerdos) producen epítomos de  $\alpha$ -gal, el xenotrasplante de material de matriz de tejido acelular de estos mamíferos a primates puede provocar el rechazo debido a que el anti-Gal de primates se une a los epítomos  $\alpha$ -gal en la matriz de tejido acelular. Esta unión da como resultado la destrucción del tejido acelular por fijación del complemento y por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. U. Galili et al., Immunology Today 14: 480 (1993); M. Sandrin y col., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 90: 11391 (1993); H. Good et al., Transplant. Proc. 24: 559 (1992); B. H. Collins et al., J. Immunol. 154: 5500 (1995).

Como se describe en detalle a continuación, en diversas realizaciones, los productos de tratamiento de tejidos pueden ser procesados para eliminar antígenos tales como  $\alpha$ -gal, por ejemplo, a través de tratamiento químico o enzimático. Alternativamente, los productos de tratamiento de tejidos pueden ser producidos a partir de animales que han sido modificados genéticamente para carecer de estos epítomos.

Los productos de tratamiento de tejidos pueden ser seleccionados para proporcionar una variedad de diferentes propiedades biológicas y mecánicas. Por ejemplo, un producto de tratamiento de tejidos puede ser seleccionado para proporcionar una estructura en la que las células nativas del tejido que rodea un producto de tratamiento de tejidos implantado puedan migrar y proliferar, y de este modo mejorar la velocidad o el nivel general de reparación, regeneración, cicatrización o tratamiento del tejido nativo. Por ejemplo, una matriz de tejido acelular, cuando se implanta en o dentro de la fascia, puede seleccionarse para permitir la regeneración de la fascia sin fibrosis excesiva o formación de cicatrices.

En ciertas realizaciones, los productos de tratamiento de tejidos que comprenden tejido humano o animal están total o sustancialmente libres de todas las células presentes normalmente en el tejido del que se deriva el producto de tratamiento de tejido. Como se usa en el presente documento, "sustancialmente libre de todas las células" se refiere a que el producto de tratamiento de tejidos contiene menos del 20%, 10%, 5%, 1%, 0,1%, 0,01%, 0,001%, o 0,0001% (o cualquier porcentaje entre los mismos) de las células que normalmente crecen dentro de la matriz acelular del tejido antes de la descelularización.

En algunas realizaciones, los productos de tratamiento de tejidos pueden incluir estructuras extracelulares que han sido repobladas con células viables. Se pueden usar varios tipos de células para la repoblación, incluidas las células madre, como, por ejemplo, las células madre embrionarias, las células madre adultas (por ejemplo, las células madre mesenquimales) y/o las células neuronales. También puede usarse cualquier otra célula viable. En algunas realizaciones, las células son células de mamífero. Las mencionadas células pueden promover la migración, proliferación y/o vascularización de los tejidos nativos. En diversas realizaciones, las células viables se aplican a la matriz de tejido acelular antes o después de la implantación de un producto de tratamiento de tejido.

En ciertas realizaciones, los productos de tratamiento de tejidos comprenden uno o más agentes adicionales. En algunas realizaciones, el agente adicional puede comprender un agente antiinflamatorio, un analgésico o cualquier otro agente terapéutico o beneficioso deseado. En ciertas realizaciones, el agente adicional puede comprender, por ejemplo, al menos un factor de crecimiento o señalización agregado (por ejemplo, un factor de crecimiento celular, un factor angiogénico, un factor de diferenciación, una citocina, una hormona y/o una quimiocina). Estos agentes adicionales pueden promover la migración, proliferación y/o vascularización de tejidos nativos. En algunas realizaciones, el factor de crecimiento o señalización está codificado por una secuencia de ácido nucleico contenida dentro de un vector de expresión. Preferiblemente, el vector de expresión está en una o más de las células viables que pueden agregarse, opcionalmente, a un producto de tratamiento de tejidos. Como se usa en el presente documento, el término "vector de expresión" se refiere a cualquier construcción de ácido nucleico que sea capaz de ser absorbida por una célula, que contenga una secuencia de ácido nucleico que codifique una proteína deseada y contenga las otras secuencias de ácido nucleico necesarias (por ejemplo, promotores, potenciadores, codones de iniciación y terminación, etc.) para asegurar al menos una expresión mínima de la proteína deseada en la célula.

En diversas realizaciones, se proporciona un producto de tratamiento de tejidos unido a un agente quelante. En ciertas realizaciones, el producto de tratamiento de tejidos está acoplado a al menos un (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o más) agente quelante. El uno o más agentes quelantes pueden comprender, en algunas realizaciones, cualquier agente quelante que pueda unirse a un grupo amina, hidroxilo o tiol libre en el producto de tratamiento de tejidos. En ciertas realizaciones, el agente quelante puede comprender ácido iminodiacético (IDA), ácido nitrilotriacético (NTA), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y/o ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA). En ciertas realizaciones, IDA es el agente quelante. En algunas realizaciones, IDA está presente en el producto de tratamiento de tejidos en una concentración de entre alrededor de 0,025mM y alrededor de 10,0mM.

En algunas realizaciones, el agente quelante se une covalentemente a un agente de activación que puede unirse covalentemente al producto de tratamiento de tejidos, por ejemplo, al unirse a grupos amina, hidroxilo o tiol libres en el producto de tratamiento de tejidos. Como se usa en el presente documento, un "agente de activación" es cualquier agente que pueda reaccionar con un agente quelante y permita que el agente quelante se una de forma covalente a un

5 producto de tratamiento de tejidos. Por ejemplo, un agente de activación puede reaccionar con un grupo de ácido carboxílico en un agente quelante para formar un éster que reaccionará con un grupo amina en un producto de tratamiento de tejidos. En ciertas realizaciones, el agente de activación es N-hidroxisulfosuccinimida (NHS), ácido subérico bis (éster de N-hidroxisuccinimida), 1,4-butanodiol diglicidil éter, epibromohidrina o 1,2,7,8-diepoxiocetano.

10 En diversas realizaciones, el producto de tratamiento de tejidos unido a al menos un agente quelante puede servir como una plataforma para la unión de diversos metales, proteínas y/u otros aditivos químicos diferentes. Por ejemplo, cualquier metal, proteína u otro químico deseado que sea capaz de unir un agente quelante puede unirse fácilmente al producto de tratamiento de tejidos al poner en contacto el tejido con el metal, la proteína y/u otro agente químico. De manera similar, cualquier proteína de unión a metal puede unirse fácilmente al producto de tratamiento de tejidos al poner en contacto el tejido con el metal apropiado y la proteína deseada.

15 Por consiguiente, en ciertas realizaciones, un producto de tratamiento de tejidos unido a al menos un agente quelante, como se describe en el presente documento, proporciona una plataforma flexible para la co-entrega de códigos del producto de tratamiento de tejidos y una amplia variedad de componentes o aditivos adicionales a un sitio de tratamiento, reparación y/o regeneración de tejidos. Los componentes adicionales pueden intercambiarse al poner en contacto el producto de tratamiento de tejidos que está unido a al menos un agente quelante con un componente adicional diferente. Además, debido a que los componentes adicionales se inmovilizan en el producto de tratamiento de tejidos a través de la unión al agente quelante, no migrarán ni se disolverán ni se dispersarán del sitio de la implantación. Por lo tanto, se puede mantener una concentración local más alta de los aditivos mientras se usa una concentración general más baja de aditivos.

20 Además de la plataforma flexible proporcionada por los productos de tratamiento de tejidos unidos a agentes quelantes, en ciertas realizaciones el uno o más agentes quelantes en un producto de tratamiento de tejidos pueden proporcionar directamente ciertas propiedades beneficiosas después de la implantación del producto de tratamiento de tejidos en un sitio huésped. Por ejemplo, el agente quelante unido al tejido acelular o al material sintético (por ejemplo, espuma de poliuretano, derivado de ácido hialurónico, quitosano, policaprolactona, poliglicólido, polilactida, polidioxano (u otros ésteres de poliéter), poli-(lactida-co-glicólido) y/o polihidroxialconatos) pueden servir para aislar o eliminar metales indeseables de un sitio de implantación.

25 En ciertas realizaciones, se proporciona un producto de tratamiento de tejidos funcionalizado, que comprende un producto de tratamiento de tejidos unido a un agente quelante y al menos un metal (por ejemplo, al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más metales). El agente quelante en el producto de tratamiento de tejidos sirve para unir e inmovilizar el metal en el producto de tratamiento de tejidos. En algunas realizaciones, IDA, NTA, EDTA, DTPA es el agente quelante que inmoviliza el metal. En ciertas realizaciones, IDA es el agente quelante que inmoviliza al menos un metal en el producto de tratamiento de tejidos. En algunas realizaciones, el metal es calcio, zinc, cobre, magnesio, manganeso, cobalto, níquel y/o plata. En algunas realizaciones, el calcio, zinc, cobre, cobalto, níquel, magnesio, manganeso y/o la plata son movilizados por IDA, NTA, EDTA y/o DTPA en el producto de tratamiento de tejidos. En algunas realizaciones, el zinc se inmoviliza por IDA en el producto de tratamiento de tejidos.

30 En diversas realizaciones, el metal que está inmovilizado en el producto de tratamiento de tejidos se selecciona por sus propiedades antimicrobianas o su capacidad para inhibir el crecimiento de bacterias en un producto de tratamiento de tejido. Por ejemplo, se sabe que los metales como la plata, el zinc y el cobre inhiben el crecimiento de bacterias. Estos metales pueden usarse, por ejemplo, para evitar que crezcan las bacterias en un sitio de implantación en un producto de tratamiento de tejidos implantado. También se puede usar cualquier otro metal con propiedades similares. En ciertas realizaciones, se usa una combinación de al menos dos metales diferentes (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más) que tienen propiedades antimicrobianas o inhibidoras del crecimiento bacteriano. El metal o los metales se inmovilizan en el producto de tratamiento de tejidos a través de la interacción con el agente quelante, y de este modo se evita que el metal se difunda en el entorno acuoso del sitio del implante. En ciertas realizaciones, la concentración de metal en el producto de tratamiento de tejidos es suficiente para reducir la carga biológica. En algunas realizaciones, se logra una concentración suficiente de metal al poner en contacto el producto de tratamiento de tejidos con una solución que contiene el metal en una concentración de al menos alrededor de 0,5, 1,0, 1,5, 2,0mM (o cualquier concentración entre los mismos).

35 En diversas realizaciones, el metal que está inmovilizado en el producto de tratamiento de tejidos se selecciona por su capacidad para servir como un sitio de unión para una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o más) metaloenzimas o proteínas de unión a metal deseadas. Por ejemplo, muchas metaloenzimas o proteínas de unión a metal se unirán al calcio, magnesio, manganeso, zinc, cobalto, níquel y/o cobre. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, el metal inmovilizado es calcio, magnesio, manganeso, zinc, cobalto, níquel y/o cobre, y de este modo se proporciona uno o más sitios de unión para una o más metaloenzimas o proteínas de unión a metal.

40 En diversas realizaciones, se proporciona un producto de tratamiento de tejidos funcionalizado, que comprende un producto de tratamiento de tejidos unido a un agente quelante y al menos un metal, y que además comprende una metaloenzima o proteína de unión a metal. En diversas realizaciones, la metaloenzima o proteína de unión a metal es cualquier compuesto bioactivo deseado capaz de unirse a un metal que está inmovilizado en un producto de tratamiento de tejidos. En algunas realizaciones, uno o más de estos compuestos bioactivos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o más compuestos bioactivos) están unidos al producto de tratamiento de tejidos. En algunas realizaciones, las metaloenzimas o proteínas de unión a metal son capaces de unirse a un metal (por ejemplo, magnesio, manganeso, calcio, zinc, cobalto, níquel y/o cobre) que está inmovilizado en un producto de tratamiento de tejidos.

En diversas realizaciones, la una o más metaloenzimas o proteínas de unión a metal se seleccionan de metalopeptidasas antimicrobianas o metaloproteinasas de matriz. En ciertas realizaciones, la metalopeptidasa o metaloproteinasa de matriz retiene sus propiedades antimicrobianas (por ejemplo, la capacidad de reducir o inhibir la carga biológica en el producto de tratamiento de tejidos) después de unirse al metal en el producto de tratamiento de tejidos. En una realización, la metalopeptidasa antimicrobiana utilizada es la lisostafina. La lisostafina es una peptidasa aglutinante de zinc que puede adherirse a las paredes celulares de ciertas especies de estafilococos, como *S. aureus*, lo que resulta en la muerte celular bacteriana. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, el producto de tratamiento de tejidos funcionalizado comprende lisostafina unida a zinc inmovilizado en un producto de tratamiento de tejidos. En algunas realizaciones, el uso de productos de tratamiento de tejidos funcionalizados con lisostafina puede ayudar a reducir la carga biológica en un producto de tratamiento de tejidos implantado y, de ese modo, promover o mejorar el tratamiento, reparación y/o regeneración de los tejidos (por ejemplo, al reducir el riesgo de infección en el sitio de implantación).

En algunas realizaciones, el producto de tratamiento de tejidos funcionalizado comprende al menos una metaloproteinasa de matriz. Las metaloproteinasas de matriz son una familia de enzimas proteolíticas involucradas en la remodelación de matrices extracelulares. Las enzimas actúan al adherirse a áreas específicas que tienen proteínas de matriz extracelular y proporcionan un medio para promover la migración celular y la regeneración de productos de tratamiento de tejidos implantados. Las metaloproteinasas de la matriz son importantes para la regulación de la proliferación celular, la migración, la diferenciación, la angiogénesis y la inflamación. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el uso de productos de tratamiento de tejidos funcionalizados con metaloproteinasas de matriz puede promover o mejorar el tratamiento, reparación y/o regeneración de tejidos.

En diversas realizaciones, los productos de tratamiento de tejidos son funcionalizados con metales y/o metaloenzimas y/o proteínas de unión a metal que se seleccionan por su capacidad para reducir o inhibir la carga biológica (es decir, su capacidad para reducir el número de microorganismos que crecen en las composiciones, o para evitar un aumento en el número de microorganismos que puedan crecer en las composiciones). Por lo tanto, en algunas realizaciones, los productos de tratamiento de tejidos funcionalizados tienen una carga biológica reducida o no exhiben un aumento en la carga biológica después de la implantación en un tejido huésped. En algunas realizaciones, un producto de tratamiento de tejidos funcionalizado carece sustancialmente de toda carga biológica (es decir, los productos de tratamiento de tejidos son asépticos o estériles). Como se usa en el presente documento, "que carezca sustancialmente de toda carga biológica" se refiere a un producto de tratamiento de tejidos en el que la concentración de microorganismos en crecimiento es inferior al 1%, 0,1%, 0,01%, 0,001% o 0,0001% (o cualquier porcentaje entre los mismos) de ese crecimiento en productos de tratamiento de tejidos que no han sido funcionalizados.

Los productos de tratamiento de tejidos, como se describe anteriormente, pueden proporcionarse envasados, congelados, liofilizados, hidratados y/o deshidratados. En ciertas realizaciones, los productos de tratamiento de tejidos envasados son estériles. En ciertas realizaciones, los productos de tratamiento de tejidos se proporcionan en un kit que comprende un producto de tratamiento de tejidos empaquetado e instrucciones para preparar y/o usar los productos de tratamiento de tejidos.

#### **Procedimientos para hacer productos de tratamiento de tejidos**

En el presente documento se describen procedimientos para producir productos de tratamiento de tejidos. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende seleccionar un tejido que contiene una matriz de colágeno extracelular; descelularizar parcial o completamente el tejido; unir al menos un agente quelante al tejido; y funcionalizar el tejido con al menos un metal, una metaloenzima y/o una proteína de unión a metal. En algunas realizaciones, un material sintético, como, por ejemplo, un derivado de ácido hialurónico, quitosano, policaprolactona, poliglicólido, polilactida, polidioxano (u otros ésteres de poliéter), poli-(lactida-co-glicólido), y/o polihidroxicarbonatos, se usan solos o en combinación con un tejido descelularizado para proporcionar una estructura artificial para la migración y proliferación de células nativas del tejido que rodea el sitio del implante. En estas realizaciones, el procedimiento para producir un producto de tratamiento de tejidos comprende seleccionar material sintético; opcionalmente, seleccionar un tejido que contiene una matriz de colágeno extracelular y descelularizar parcial o completamente el tejido; opcionalmente combinar el material sintético con el tejido parcial o completamente descelularizado; unir al menos un agente quelante al material sintético y/o al tejido parcial o completamente descelularizado; y funcionalizar al poner en contacto el producto de tratamiento de tejidos con al menos metal, metaloenzima y/o proteína de unión a metal.

En otras realizaciones, un material sintético, como, por ejemplo, una espuma de poliuretano (por ejemplo, GRANUFOAM®, Kinetics Concepts, Inc., San Antonio, TX), puede usarse solo o en combinación con un tejido descelularizado, como un producto de tratamiento o reparación de heridas. En estas realizaciones, el producto de tratamiento de tejidos sirve para sellar una herida mientras proporciona una plataforma para la entrega de una variedad de agentes quelantes, metales y/o proteínas de unión a metal en un sitio de la herida. En algunas realizaciones, donde se usan materiales sintéticos, el procedimiento comprende seleccionar un material sintético, y unir al menos un agente quelante al material; y funcionalizar el material con al menos un metal, metaloenzima y/o proteína de unión a metal.

En algunas realizaciones, puede prepararse un producto de tratamiento de tejidos a partir de cualquier tejido que sea adecuado para la descelularización y la posterior implantación. Los tejidos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, hueso, piel, dermis, intestino, vejiga urinaria, tendón, ligamento, músculo, fascia, tejido neurológico, tejido vascular, vaso, hígado, corazón, pulmón, riñón, cartílago y/o cualquier otro tejido adecuado. En ciertas realizaciones, los tejidos pueden incluir un tejido blando de mamífero. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el tejido puede comprender dermis de mamífero. En ciertas realizaciones, la dermis puede separarse de la epidermis circundante y/u otros tejidos,

como, por ejemplo, la grasa subcutánea. En ciertas realizaciones, el tejido puede comprender submucosa del intestino delgado. En ciertas realizaciones, el tejido puede incluir fuentes humanas o no humanas. Ejemplos de fuentes de tejido no humano incluyen, pero no se limitan a, cerdos, ovejas, cabras, conejos, monos y/u otros mamíferos no humanos.

5 En algunas realizaciones, un producto de tratamiento de tejidos se prepara al descelularizar parcial o completamente un tejido donante. Procedimientos a modo de ejemplo para descelularizar tejido se describen en la Patente de Estados Unidos 6,933.326 y la Solicitud de Patente de Estados Unidos 2010/0272782. En algunas realizaciones, el tejido descelularizado proporciona un entramado estructural extracelular poroso dentro del cual las células del tejido nativo circundante pueden migrar y proliferar después de la implantación en un sitio huésped. En ciertas realizaciones a modo de ejemplo, el tejido acelular comprende ALLODERM® o STRATTICE™, que son productos dérmicos humanos acelulares y productos dérmicos porcinos, respectivamente, y están disponibles en LifeCell Corporation (Branchburg, NJ).

15 En diversas realizaciones, los pasos generales implicados en la producción de una matriz de tejido acelular o parcialmente descelularizada incluyen proporcionar tejido de un donante (por ejemplo, un cadáver humano o una fuente animal) y eliminar células en condiciones que preserven la función biológica y estructural de la matriz extracelular. En ciertas realizaciones, el tejido puede lavarse para eliminar cualquier crioprotector residual y/u otros contaminantes. Las soluciones utilizadas para el lavado pueden ser cualquier solución fisiológicamente compatible. Los ejemplos de soluciones de lavado adecuadas incluyen agua destilada, solución salina tamponada con fosfato (PBS) o cualquier otra solución salina biocompatible.

20 En ciertas realizaciones, el tejido lavado puede tratarse químicamente para estabilizar el tejido a fin de evitar la degradación bioquímica y/o estructural antes, durante o después de la remoción de células. En diversas realizaciones, la solución estabilizante detiene y previene la degradación osmótica, hipóxica, autolítica y/o proteolítica; protege contra la contaminación microbiana; y/o reduce el daño mecánico que puede ocurrir durante la descelularización de tejidos que contienen, por ejemplo, componentes del músculo liso (por ejemplo, vasos sanguíneos). La solución estabilizadora puede contener un tampón apropiado, uno o más antioxidantes, uno o más agentes oncóticos, uno o más antibióticos, uno o más inhibidores de la proteasa y/o uno o más relajantes del músculo liso.

25 En diversas realizaciones, el tejido se coloca entonces en una solución de descelularización para remover células viables y no viables (por ejemplo, células epiteliales, células endoteliales, células de músculo liso y fibroblastos, etc.) de la matriz extracelular sin dañar la integridad biológica y/o estructural de la matriz extracelular. La solución de descelularización puede contener un tampón apropiado, sal, un antibiótico, uno o más detergentes (por ejemplo, TRITON X-100™, dodecil sulfato de sodio, desoxicolato de sodio, monooleato de sorbitán polioxitileno (20), etc.), uno o más agentes para prevenir el enlace cruzado, uno o más inhibidores de la proteasa y/o una o más enzimas. En algunas realizaciones, la solución de descelularización comprende 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 1,0%, 1,5%, 2,0%, 2,5%, 3,0%, 3,5%, 4,0%, 4,5% o 5,0% (o cualquier porcentaje entre los mismos) de TRITON X-100™ y, opcionalmente, 10mM, 15mM, 20mM, 25mM, 30mM, 35mM, 40mM, 45mM o 50mM EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) (o cualquier concentración entre las mismas). En algunas realizaciones, el tejido es incubado en la solución de descelularización a 25, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41 o 42 grados Celsius (o cualquier temperatura entre las mismas), y opcionalmente, se aplica una agitación suave a 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 o 150rpm (o cualquier rpm entre las mismas). La incubación puede ser de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 20, 24, 36 o 48 horas (o en cualquier momento entre las mismas). La duración del tiempo de exposición a la solución de descelularización, o la concentración de detergente y/u otros agentes descelularizantes pueden ajustarse para descelularizar parcial o más completamente el tejido. En ciertas realizaciones, pueden usarse detergentes adicionales para remover células de la muestra del tejido. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se agrega 1, 2, 3, 4 o 5% (o cualquier porcentaje entre los mismos) de desoxicolato de sodio (o cualquier porcentaje entre los mismos) a la solución de descelularización para remover las células grasas del tejido.

30 En algunas realizaciones, después de la descelularización, la muestra de tejido se lava a fondo. Cualquier solución fisiológicamente compatible puede usarse para lavar. Los ejemplos de soluciones de lavado adecuadas incluyen agua destilada, solución salina tamponada con fosfato (PBS) o cualquier otra solución salina biocompatible. En ciertas realizaciones, por ejemplo, cuando se usa material xenogénico, el tejido descelularizado se trata durante la noche a temperatura ambiente con una solución de desoxirribonucleasa (DNasa). En algunas realizaciones, la muestra de tejido se trata con una solución de ADNasa preparada en un tampón de ADNasa (HEPES 20mM (ácido 4- (2-hidroxietil) -1-piperazina-metanosulfónico), CaCl<sub>2</sub> 20mM y MgCl<sub>2</sub> 20mM). Opcionalmente, puede agregarse una solución antibiótica (por ejemplo, gentamicina) a la solución de DNasa. Puede usarse cualquier tampón de DNasa adecuado, siempre que el tampón proporcione una actividad de DNasa adecuada.

35 Si bien una matriz de tejido acelular o parcialmente descelularizada puede derivarse del tejido de uno o más animales donantes de la misma especie que el animal receptor previsto, este no es necesariamente el caso. Por lo tanto, por ejemplo, una matriz de tejido acelular puede derivarse de tejido porcino e implantarse en un paciente humano. Las especies que pueden servir como donantes y/o receptores de matrices de tejido acelular incluyen, sin limitación, mamíferos, como, por ejemplo, humanos, primates no humanos (por ejemplo, monos, babuinos o chimpancés), cerdos, vacas, caballos, cabras, ovejas, perros, gatos, conejos, cobayas, jerbos, hámsters, ratas o ratones.

40 En ciertas realizaciones, el tejido descelularizado puede ser tratado con una o más enzimas para remover antígenos indeseables, por ejemplo, un antígeno que normalmente no se expresa en el animal receptor y, por lo tanto, puede provocar una respuesta inmune y/o rechazo del producto de tratamiento de tejidos implantado. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el tejido descelularizado puede tratarse con alfa-galactosidasa para eliminar restos de alfa-galactosa (a-

gal). En algunas realizaciones, para eliminar enzimáticamente los epítomos de  $\alpha$ -gal, después de lavar a fondo el tejido con una solución salina, el tejido puede ser sometido a uno o más tratamientos enzimáticos para eliminar antígenos  $\alpha$ -gal, si están presentes en la muestra. En ciertas realizaciones, el tejido puede tratarse con una enzima de  $\alpha$ -galactosidasa para eliminar los epítomos de  $\alpha$ -gal. En una realización, el tejido se trata con  $\alpha$ -galactosidasa en una concentración de 0,2 U/ml preparada en una solución salina tamponada con fosfato 100mM a pH 6,0. En otras realizaciones, la concentración de  $\alpha$ -galactosidasa se reduce a 0,1U/ml o se aumenta a 0,3, 0,4 o 0,5 U/ml (o cualquier valor entre los mismos). En otras realizaciones, puede usarse cualquier concentración de enzima y tampón adecuados, siempre que se logre una remoción suficiente de antígeno. Además, ciertos procedimientos a modo de ejemplo del procesamiento de tejidos para reducir o remover restos de alfa-1,3-galactosa se describen en Xu et al., Tissue Engineering, vol. 15, 1-13 (2009).

En ciertas realizaciones, los animales que han sido modificados genéticamente para carecer de uno o más epítomos antigénicos pueden seleccionarse como la fuente del tejido para un producto de tratamiento de tejidos. Por ejemplo, los animales (por ejemplo, cerdos) que han sido modificados genéticamente para carecer del resto terminal  $\alpha$ -galactosa pueden seleccionarse como la fuente de tejido. Para obtener descripciones de los animales y los procedimientos apropiados para producir animales transgénicos para xenotrasplantes, consulte la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Número de Serie 10/896,594 y la Patente de los Estados Unidos Núm. 6,166,288.

En algunas realizaciones, el tejido descelularizado puede tratarse para reducir la carga biológica (es decir, para reducir el número de microorganismos que crecen en el tejido). En algunas realizaciones, el tejido se trata de modo que carezca sustancialmente de toda carga biológica (es decir, el tejido es aséptico o estéril). Los procedimientos de reducción de carga biológica adecuados son conocidos para un experto en la materia y pueden incluir la exposición del producto de tratamiento de tejidos a la radiación. La irradiación puede reducir o eliminar sustancialmente la carga biológica. En algunas realizaciones, se suministra una dosis absorbida de 15-17 kGy e-beam para reducir o eliminar sustancialmente la carga biológica. En diversas realizaciones, la cantidad de radiación a la que se expone el producto de tratamiento de tejidos puede estar entre 5Gy y 50 kGy. Las formas adecuadas de radiación pueden incluir radiación gamma, radiación e-beam y radiación de rayos X. Otros procedimientos de irradiación se describen en la solicitud de Estados Unidos 2010/0272782.

En diversas realizaciones, puede usarse un material sintético en lugar de o en combinación con un tejido acelular para proporcionar una estructura extracelular en un producto de tratamiento de tejidos. Por ejemplo, un producto de tratamiento de tejidos puede comprender un material sintético como, por ejemplo, un derivado del ácido hialurónico, quitosano, policaprolactona, poliglicólido, polilactida, polidioxano (u otros ésteres de poliéter), poli-(lactida-co-glicólido) y/o polihidroxialconatos en lugar de tejido acelular. En algunas realizaciones, un producto de tratamiento de tejidos comprende una combinación de componentes de estructura de matriz natural y sintética (por ejemplo, una combinación de derivados de ácido hialurónico y tejido acelular o parcialmente descelularizado).

En ciertas realizaciones, después de que se forma la estructura natural o artificial de un producto de tratamiento de tejidos, pueden sembrarse opcionalmente células viables en la matriz. En algunas realizaciones, pueden agregarse células viables a las matrices a través de técnicas de co-cultivo celular in vitro estándar antes del trasplante, o por repoblación in vivo después del trasplante. La repoblación in vivo puede ser por la migración de células nativas del tejido circundante a la matriz o por infusión o inyección de células viables obtenidas del receptor o de otro donante a la matriz in situ. Pueden usarse varios tipos de células, incluidas las células madre, como, por ejemplo, las células madre embrionarias y/o las células madre adultas (por ejemplo, las células madre mesenquimales). También puede usarse cualquier otra célula viable. En algunas realizaciones, las células son células de mamífero. En ciertas realizaciones, las células son histocompatibles con el sujeto en el que se implantan. Las mencionadas células pueden promover la migración, proliferación y/o vascularización de los tejidos nativos. En diversas realizaciones, las células pueden aplicarse directamente a la matriz de un producto de tratamiento de tejidos justo antes o después de la implantación.

En ciertas realizaciones, se pueden agregar uno o más agentes adicionales a la matriz extracelular de un producto de tratamiento de tejidos. En algunas realizaciones, el agente adicional puede comprender un agente antiinflamatorio, un analgésico o cualquier otro agente terapéutico o beneficioso deseado. En ciertas realizaciones, el agente adicional puede comprender al menos un factor de crecimiento o señalización agregado (por ejemplo, un factor de crecimiento celular, un factor angiogénico, un factor de diferenciación, una citocina, una hormona y una quimiocina). En algunas realizaciones, estos agentes adicionales pueden promover la migración, proliferación y/o vascularización de tejido nativo dentro del producto de tejido implantado. En algunas realizaciones, el factor de crecimiento o señalización está codificado por una secuencia de ácido nucleico contenida dentro de un vector de expresión. Preferiblemente, el vector de expresión está en una o más de las células viables que pueden incluirse, opcionalmente, en un producto de tratamiento de tejidos. Como se usa en el presente documento, el término "vector de expresión" se refiere a cualquier construcción de ácido nucleico que sea capaz de ser absorbida por una célula, que contenga una secuencia de ácido nucleico que codifique una proteína deseada y contenga las otras secuencias de ácido nucleico necesarias (por ejemplo, promotores, potenciadores, codón de terminación, etc.) para asegurar al menos una expresión mínima de la proteína deseada en la célula.

En diversas realizaciones, un producto de tratamiento de tejidos (que comprende un tejido parcial o totalmente descelularizado o un material sintético que proporcione una estructura extracelular) está unido a al menos un (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o más) agentes quelantes. El uno o más agentes quelantes pueden comprender, en algunas realizaciones, cualquier agente quelante que pueda unirse a un grupo amina, hidroxilo o tiol libre en el producto de

tratamiento de tejidos. En ciertas realizaciones, el agente quelante puede comprender IDA, NTA, EDTA y / o DTPA. En ciertas realizaciones, IDA es el agente quelante. En algunas realizaciones, IDA se usa en una concentración de entre alrededor de 0,025mM y alrededor de 10,0mM.

5 En ciertas realizaciones, un agente quelante, como, por ejemplo, IDA, NTA, EDTA y/o DTPA, primero se hace reaccionar con un agente de activación. El agente quelante activado se une covalentemente al producto de tratamiento de tejidos, por ejemplo, al unirse a grupos de amina, hidroxilo o tiol libres en el producto de tratamiento de tejidos. En algunas realizaciones, el agente de activación es N-hidroxisulfosuccinimida (NHS). El NHS puede servir para unir covalentemente el agente quelante a las aminas libres presentes en el producto de tratamiento de tejidos, y de este modo se inmoviliza el agente quelante en el producto. En realizaciones alternativas, el agente de activación es epibromohidrina o 1,2,7,8-diepoxioctano. Los derivados de epóxido de los agentes quelantes producidos por estos agentes de activación pueden unirse covalentemente a grupos amina, tiol o hidroxilo libres en el producto de tratamiento de tejidos, y de este modo se inmoviliza el agente quelante en el producto. La Figura 1A ilustra procedimientos a modo de ejemplo de activación de IDA al usar NHS, epibromohidrina y 1,2,7,8-diepoxioctano.

15 En ciertas realizaciones en las que el producto de tratamiento de tejidos comprende una estructura extracelular proporcionada por un material sintético, el producto de tratamiento de tejidos puede unirse a uno o más agentes quelantes durante la fabricación del material sintético. En otras realizaciones, el producto de tratamiento de tejidos puede unirse a uno o más agentes quelantes después de la fabricación del material sintético. Por ejemplo, la unión puede tener lugar inmediatamente antes de la implantación del producto de tratamiento de tejidos.

20 En diversas realizaciones, un producto de tratamiento de tejidos unido a al menos un agente quelante puede servir como una plataforma para la unión de diversos metales, proteínas y/u otros aditivos químicos diferentes. Por ejemplo, cualquier metal, proteína y/u otro químico que sea capaz de ser inmovilizado por un agente quelante puede unirse fácilmente al producto de tratamiento de tejidos al poner en contacto el producto con el metal, la proteína y/o el otro agente químico. De manera similar, cualquier proteína de unión a metal puede unirse fácilmente al producto de tratamiento de tejidos al ponerse en contacto el producto con el metal apropiado y la proteína deseada.

25 En ciertas realizaciones, un producto de tratamiento de tejidos que está unido a uno o más agentes quelantes se funcionaliza poniendo al ponerse en contacto el producto con una solución que contenga al menos un metal (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o más). El metal interactuará con el agente quelante en el producto de tratamiento de tejidos, y de este modo se inmoviliza el metal en el producto. Los metales adecuados para su uso en productos de tratamiento de tejidos funcionalizados incluyen cualquier metal capaz de interactuar con un agente quelante en un producto de tratamiento de tejidos y que tenga propiedades deseables.

30 En algunas realizaciones, se pueden usar metales que proporcionen propiedades antimicrobianas (por ejemplo, plata, zinc y/o cobre). Como se usa en el presente documento, una propiedad antimicrobiana que posee metal es una que reduce o inhibe la carga biológica (es decir, da como resultado un número reducido de microorganismos que crecen en el producto de tratamiento de tejidos o evita un aumento en el número de microorganismos que crecen en el producto de tratamiento de tejidos después de la implantación en un tejido huésped), en comparación con el producto de tratamiento de tejidos en ausencia de funcionalización metálica. En algunas realizaciones, un producto de tratamiento de tejidos se funcionaliza con al menos un metal de modo que el producto de tejidos resultante carece sustancialmente de carga biológica (es decir, el producto de tratamiento de tejidos es aséptico o estéril). Como se usa en el presente documento, "que carezca sustancialmente de toda carga biológica" se refiere a un producto de tratamiento de tejidos en el que la concentración de microorganismos en crecimiento es inferior al 1%, 0,1%, 0,01%, 0,001% o 0,0001% (o cualquier porcentaje entre los mismos) de ese crecimiento que en productos de tratamiento de tejidos no tratados.

35 En algunas realizaciones, se prepara un producto de tratamiento de tejidos que tiene propiedades antimicrobianas al poner en contacto el producto de tratamiento de tejidos con una solución que contiene una concentración de metal suficientemente alta de manera que el metal que se une al producto de tratamiento de tejidos funcionalizado será suficiente para producir una carga biológica reducida. En ciertas realizaciones, se logra una concentración suficiente de metal al poner en contacto el producto de tratamiento de tejidos con una solución que contiene el metal en una concentración de al menos alrededor de 0,5, 1,0, 1,5, 2,0mM (o cualquier concentración entre las mismas). En algunas realizaciones, el metal es zinc y está presente en solución en una concentración de al menos alrededor de 0,5, 1,0, 1,5, 2,0mM (o cualquier concentración entre las mismas).

40 En algunas realizaciones, un producto de tratamiento de tejidos unido a uno o más agentes quelantes se funcionaliza al ponerse en contacto con una solución que contiene calcio, zinc, magnesio, manganeso, cobalto, níquel, plata y/o cobre. En algunas realizaciones, calcio, zinc, magnesio, manganeso, cobalto, níquel, plata y/o cobre en la solución se encuentra en una concentración de alrededor de 1,0 a alrededor de 10mM (por ejemplo, alrededor de 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, o 10,0mM o en cualquier concentración entre las mismas).

45 En algunas realizaciones, el agente quelante IDA se une a un producto de tratamiento de tejidos, que después se funcionaliza con plata, zinc y/o cobre. En ciertas realizaciones, los productos de tratamiento de tejidos funcionalizados con plata, zinc y/o cobre tienen una carga biológica reducida o no exhiben un aumento en la carga biológica después de la implantación en un tejido huésped, en comparación con los productos de tratamiento de tejidos implantados que no fueron funcionalizados con metal. En algunas realizaciones, los productos de tratamiento de tejidos funcionalizados con plata, zinc y/o cobre carecen sustancialmente de toda carga biológica.

50 En diversas realizaciones, un producto de tratamiento de tejidos que se ha funcionalizado con al menos un metal se

funcionaliza además al poner en contacto el producto de tratamiento de tejidos con una solución que contiene al menos una (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o más) metaloenzimas u otras proteínas de unión a metal que tengan propiedades deseadas. La una o más metaloenzimas u otras proteínas de unión a metal se seleccionan por su capacidad para unir iones metálicos (por ejemplo, calcio, zinc, magnesio, manganeso, cobalto, níquel y/o cobre) que se inmovilizan en un producto de tratamiento de tejidos. En ciertas realizaciones, el metal (que está unido al producto de tratamiento de tejidos a través del agente quelante) sirve para inmovilizar la metaloenzima u otra proteína de unión a metal en el producto de tratamiento de tejido.

En diversas realizaciones, la una o más metaloenzimas o proteínas de unión a metal se seleccionan a partir de metalopeptidasas antimicrobianas o metaloproteinasas de matriz. En ciertas realizaciones, después de la unión al metal en el producto de tratamiento de tejidos, la metalopeptidasa o metaloproteinasas de matriz retiene sus propiedades antimicrobianas (por ejemplo, la capacidad de reducir la carga biológica en el producto de tejido o prevenir un aumento en la carga biológica después de la implantación en un tejido huésped). En una realización, la metalopeptidasa antimicrobiana utilizada es la lisostafina. En ciertas realizaciones, un producto de tratamiento de tejidos funcionalizado con zinc se funcionaliza además al ponerse en contacto con una solución que contiene lisostafina, la que se une al zinc en el producto de tratamiento de tejidos. En algunas realizaciones, funcionalizar con lisostafina comprende poner en contacto el producto de tratamiento de tejidos con una solución de lisostafina en una concentración de alrededor de 1,0 a alrededor de 1000 µg/ml (por ejemplo, alrededor de 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 4,0, 5,0, 10,0, 20,0 50,0, 100, 200, 500 o 1000 µg/ml, o cualquier concentración entre las mismas). La Figura 1B ilustra un procedimiento a modo de ejemplo para funcionalizar un producto de tratamiento de tejidos con lisostafina.

En ciertas realizaciones, un producto de tratamiento de tejidos se une a IDA, se funcionaliza con zinc y se funcionaliza además con lisostafina. En algunas realizaciones, la funcionalización con lisostafina comprende poner en contacto el producto de tratamiento de tejidos con una solución de lisostafina en una concentración de alrededor de 1,0 a alrededor de 1000 µg/ml (por ejemplo, alrededor de 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 4,0, 5,0, 10,0, 20,0, 50,0, 100, 200, 500 o 1000 µg/ml, o cualquier concentración entre las mismas). En algunas realizaciones, el uso de productos de tratamiento de tejidos funcionalizados con lisostafina puede ayudar a reducir la carga biológica en un producto de tratamiento de tejidos implantado y, de ese modo, promover o mejorar el tratamiento, reparación y/o regeneración de tejidos (por ejemplo, al reducir el riesgo de infección en el sitio de implantación o al conducir al fallo temprano o a la desintegración del implante).

En algunas realizaciones, un producto de tratamiento de tejidos funcionalizado con metal se funcionaliza además al ponerse en contacto con una solución que contiene al menos una (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o más) metaloproteinasas de matriz. Las metaloproteinasas de la matriz son importantes para la regulación de la proliferación, migración, diferenciación, angiogénesis e inflamación de las células. En algunas realizaciones, la una o más metaloproteinasas de matriz comprenden colagenasa, gelatinasa, estromolisina, matrilisina y/o elastasa. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la funcionalización con metaloproteinasas de matriz puede promover o mejorar el tratamiento, reparación y/o regeneración de los tejidos.

En diversas realizaciones, el metal, las metaloenzimas y/o las proteínas de unión a metal que se utilizan para funcionalizar los productos de tratamiento de tejidos se seleccionan por su capacidad para reducir o inhibir la carga biológica (es decir, para reducir el número de microorganismos o para prevenir un aumento en el número de microorganismos que crecen en un producto de tratamiento de tejidos implantado). En algunas realizaciones, un producto de tratamiento de tejidos funcionalizado carece sustancialmente de toda carga biológica.

#### 40 Procedimientos de uso

En el presente documento se divulgan procedimientos para usar los productos de tratamiento de tejidos descritos anteriormente. En diversas realizaciones, los productos de tratamiento de tejidos se implantan en un tejido huésped que necesita reparación, regeneración o tratamiento. La matriz extracelular proporcionada por el tejido descelularizado o por el material sintético (por ejemplo, quitosano, la policaprolactona, el poliglicólido, la polilactida, el polidioxano (u otros ésteres de poliéter), el poli-(lactida-co-glicólido) y/o los polihidroxialconatos) en el producto de tratamiento de tejidos pueden proporcionar una estructura en la que las células nativas del tejido circundante puedan migrar y proliferar. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, las estructuras proporcionadas por los productos de tratamiento de tejidos pueden mejorar y/o promover el tratamiento, reparación y/o regeneración de tejidos. Además, como se trata en más detalle a continuación, los productos de tratamiento de tejidos pueden usarse, en ciertas realizaciones, para suministrar compuestos adicionales que tengan varias propiedades deseables, como, por ejemplo, agentes antimicrobianos y/o compuestos que mejoren la migración, proliferación y revascularización de células nativas dentro del producto de tratamiento de tejidos implantado.

En algunas realizaciones, un producto de tratamiento de tejidos puede usarse en la reparación o tratamiento de heridas. El producto puede proporcionar un material para sellar una herida al mismo tiempo que sirve como plataforma para el suministro de diversos agentes quelantes, metales y/o proteínas de unión a metal, como se describe con más detalle a continuación. Por ejemplo, el producto de tratamiento de tejidos para su uso en la reparación o tratamiento de heridas puede comprender una espuma de poliuretano, como, por ejemplo, V.A.C. GRANUFOAM® (Kinetics Concepts, Inc., San Antonio, TX), sola o en combinación con un tejido parcial o completamente descelularizado.

En ciertas realizaciones, los productos de tratamiento de tejidos que se han unido a al menos un agente quelante pueden implantarse en un tejido huésped y usarse para aislar metales indeseables al tiempo que proporcionan una estructura extracelular que promueve la migración y proliferación de las células nativas. Por ejemplo, los productos de tratamiento

de tejidos que se han unido a IDA pueden usarse para aislar o remover zinc de un sitio de implante, como, por ejemplo, un sitio de herida que contenga zinc. En ciertas circunstancias, puede ser deseable reducir los niveles de zinc en el sitio del implante, por ejemplo, para aumentar los niveles de hemoglobina, por ejemplo, después de la cirugía. Ver O'Neil-Cutting et al., J. Nutr. 111: 1969-79 (1981) (que muestra que los niveles elevados de zinc pueden reducir los niveles de hemoglobina). En otros ejemplos, cualquier metal nocivo o indeseable puede aislarse al unirse a uno o más agentes quelantes unidos a un producto de tratamiento de tejidos.

5

En ciertas realizaciones, un producto de tratamiento de tejidos unido a uno o más agentes quelantes puede servir como una plataforma flexible para el suministro rápido y fácil de una amplia variedad de metales y/o proteínas de unión a metal. Por ejemplo, se puede proporcionar un producto de tratamiento de tejidos unido a uno o más agentes quelantes, por ejemplo, a una instalación quirúrgica, y se puede acoplar rápidamente en la instalación a una amplia variedad de metales o proteínas de unión a metal al poner en contacto el producto de tratamiento de tejidos con uno o más metales y, opcionalmente, una o más proteínas de unión a metal antes de la implantación. En algunas realizaciones, se proporciona un kit que comprende un producto de tratamiento de tejidos estéril unido a uno o más agentes quelantes, una selección de soluciones estériles que comprenden uno o más metales, y/o una selección de soluciones estériles que comprenden una o más proteínas de unión a metal. La instalación quirúrgica puede entonces, en ciertas realizaciones, preparar el producto de tratamiento de tejidos funcionalizado deseado al poner en contacto el producto de tratamiento de tejidos unido a uno o más agentes quelantes con los metales y/o proteínas de unión a metal deseadas antes del uso quirúrgico. De esta manera, una instalación quirúrgica puede preparar rápidamente una amplia variedad de productos funcionalizados diferentes sin necesidad de pedir cada producto funcionalizado individualmente a un proveedor de tejidos.

10

15

20

En ciertas realizaciones, un producto de tratamiento de tejidos que se ha funcionalizado con uno o más metales se implanta en un paciente. En algunas realizaciones, el producto de tratamiento de tejidos que se implanta en un paciente se funcionaliza con uno o más metales que se seleccionan por sus propiedades antimicrobianas (es decir, su capacidad para reducir o prevenir un aumento de la carga biológica en el producto de tratamiento de tejidos después de la implantación). Las concentraciones efectivas del metal antimicrobiano variarán de acuerdo con el tipo de metal utilizado y la reducción deseada en la carga biológica. Los expertos en la materia conocen los procedimientos para determinar la concentración efectiva e incluyen, por ejemplo, la medición de las diferencias en la carga biológica después de la implantación de productos de tratamiento de tejidos que contengan diferentes concentraciones de metal, o infección bacteriana deliberada en el sitio de la implantación y la posterior medición de la carga biológica en productos de tratamiento de tejidos implantados que contengan diferentes concentraciones de metal. Por ejemplo, el metal antimicrobiano unido al producto de tratamiento de tejidos puede ser plata. En algunas realizaciones, es la plata.

25

30

En ciertas realizaciones, el producto de tratamiento de tejidos implantado que se funcionaliza con un metal antimicrobiano tiene, en cualquier momento después de la implantación en un tejido huésped, al menos un 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, o 99% (o cualquier porcentaje entre los mismos) menor concentración de microorganismos que crecen en el producto, en comparación con el producto de tratamiento de tejidos implantado que no está funcionalizado con un metal antimicrobiano. Además, al inmovilizar el metal antimicrobiano en el producto de tratamiento de tejidos a través de un agente quelante, el producto de tratamiento de tejidos funcionalizado reduce, en algunas realizaciones, la cantidad de metal que se filtrará del producto. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, puede lograrse una concentración local más alta de metal antimicrobiano en el sitio de la implantación mientras se usa una concentración general más baja. En otras realizaciones, los efectos nocivos asociados con ciertos metales antimicrobianos pueden reducirse o prevenirse al inmovilizar el metal en un producto de tratamiento de tejidos mientras se conserva la reducción beneficiosa o la inhibición de la carga biológica.

35

40

En ciertas realizaciones, un producto de tratamiento de tejidos que se ha funcionalizado con uno o más proteínas de unión a metal deseadas se implanta en un paciente y proporciona el suministro dirigido de esa proteína al sitio de implantación. El producto de tratamiento de tejidos implantado puede ser funcionalizado con cualquier proteína de unión a metal deseada que proporcionará efectos beneficiosos después de la implantación del producto de tratamiento de tejidos.

45

Por ejemplo, la proteína de unión a metal puede proporcionar propiedades antimicrobianas, y de este modo reducir o inhibir la carga biológica en el producto de tratamiento de tejidos implantado. En ciertas realizaciones, el producto de tratamiento de tejidos implantado que ha sido funcionalizado con una proteína antimicrobiana tiene, en cualquier momento después de la implantación en un tejido huésped, al menos un 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97,98, o 99% (o cualquier porcentaje entre los mismos) menor concentración de microorganismos que crecen en el producto, en comparación con el producto de tratamiento de tejidos implantado que no está funcionalizado con una proteína antimicrobiana. Por ejemplo, el producto de tratamiento de tejidos puede funcionalizarse con lisostafina, una peptidasa aglutinante de zinc que puede adherirse a las paredes celulares de ciertas cepas de estafilococos, como *S. aureus*. Las concentraciones efectivas del agente antimicrobiano, como, por ejemplo, la lisostafina, variarán de acuerdo con el tipo de agente utilizado y la reducción deseada de carga biológica. Los expertos en la materia conocen los procedimientos para determinar la concentración efectiva e incluyen, por ejemplo, la medición de diferencias en la carga biológica después de la implantación de productos de tratamiento de tejidos que contengan diferentes concentraciones de proteínas antimicrobianas o infección bacteriana deliberada en el sitio de la implantación y posterior medición de la carga biológica en productos de tratamiento de tejidos implantados que contengan diferentes concentraciones de proteínas antimicrobianas.

50

55

60

En algunas realizaciones, se prepara un producto de tratamiento de tejidos que tiene propiedades antimicrobianas al poner en contacto el producto de tratamiento de tejidos con una solución que contenga una concentración de metal suficientemente alta de manera que el metal que se une al producto de tratamiento de tejidos funcionalizado será suficiente para producir una carga biológica reducida. En ciertas realizaciones, se logra una concentración suficiente de metal al poner en contacto el producto de tratamiento de tejidos con una solución que contenga el metal en una concentración de al menos alrededor de 0,5, 1,0, 1,5, 2,0mM (o cualquier concentración entre las mismas). En algunas realizaciones, el metal es zinc y está presente en solución en una concentración de al menos alrededor de 0,5, 1,0, 1,5, 2,0mM (o cualquier concentración entre las mismas).

En otro ejemplo, un producto de tratamiento de tejidos puede funcionalizarse con una o más metaloproteinasas de matriz, que son importantes para la regulación de la proliferación, la migración y la diferenciación celular, la angiogénesis y la inflamación. En ciertas realizaciones, la una o más metaloproteinasas de matriz promueven o mejoran el tratamiento, la reparación y/o la regeneración de tejidos.

En ciertas realizaciones, la implantación de un producto de tratamiento de tejidos proporciona una estructura biocompatible que soporta la migración, proliferación y/o vascularización de los tejidos nativos necesarios para la regeneración, reparación, cicatrización y/o tratamiento de tejidos y no provoca una respuesta inmune sustancial que evite ese tipo de actividad. Como se usa en el presente documento, una "respuesta inmune sustancial" es aquella que impide la regeneración, reparación, cicatrización o tratamiento parcial o total del tejido. En ciertas realizaciones, el producto de tratamiento de tejidos implantado carece de ciertos antígenos indeseables para evitar inducir una respuesta inmune. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los productos de tratamiento de tejidos implantados carecen sustancialmente de cualquier resto de  $\alpha$ -gal que se sabe que provocan reacciones en los seres humanos.

En ciertas realizaciones, los productos de tratamiento de tejidos que están implantados en un paciente comprenden tejido humano o animal que esté total o sustancialmente libre de todas las células presentes normalmente en el tejido del que se deriva el producto de tratamiento de tejido. Como se usa en el presente documento, "sustancialmente libre de todas las células" se refiere a que el producto de tratamiento de tejidos contiene menos del 20%, 10%, 5%, 1%, 0,1%, 0,01%, 0,001% o 0,0001% (o cualquier porcentaje entre los mismos) de las células que normalmente crecen dentro de la matriz acelular del tejido antes de la descelularización.

En algunas realizaciones, los productos de tratamiento de tejidos implantados pueden incluir estructuras extracelulares que hayan sido repobladas con células viables. Pueden usarse varios tipos de células para la repoblación, incluidas las células madre, Como, por ejemplo, células madre embrionarias, células madre adultas (por ejemplo, células madre mesenquimales) y/o células neuronales. También puede usarse cualquier otra célula viable. En algunas realizaciones, las células son células de mamífero. Este tipo de células pueden promover la migración, proliferación y/o vascularización de tejidos nativos. En diversas realizaciones, las células viables se aplican a la matriz de tejido acelular antes o después de la implantación de un producto de tratamiento de tejidos.

En ciertas realizaciones, los productos de tratamiento de tejidos implantados comprenden además uno o más agentes adicionales. En algunas realizaciones, el agente adicional puede comprender un agente antiinflamatorio, un analgésico o cualquier otro agente terapéutico o beneficioso deseado que promueva la reparación, regeneración o tratamiento de tejidos después de la implantación. En ciertas realizaciones, el agente adicional puede comprender, por ejemplo, al menos un factor de crecimiento o señalización agregado (por ejemplo, un factor de crecimiento celular, un factor angiogénico, un factor de diferenciación, una citocina, una hormona y/o una quimiocina). Estos agentes adicionales pueden promover la migración, proliferación y/o vascularización de tejidos nativos.

Los productos de tratamiento de tejidos pueden implantarse en un paciente como parte de cualquier procedimiento médico en el que se desee la reparación, regeneración o tratamiento de tejidos. Por ejemplo, los productos de tratamiento de tejidos pueden implantarse después de la creación de un espacio entre los planos de los tejidos como resultado de una enfermedad, trauma o intervención quirúrgica. En algunas realizaciones, el producto puede ser implantado en un espacio entre los planos de los tejidos separados y plegarse, comprimirse o moldearse de otro modo para llenar la forma anatómica del sitio del implante. En diversas realizaciones, el producto implantado puede proporcionar una estructura para la migración, proliferación y/o revascularización del tejido nativo. Además, en ciertas realizaciones, agentes quelantes, metales y/o las proteínas de unión a metal en los productos de tratamiento de tejidos pueden ser suministrados directamente al tejido nativo circundante después de la implantación a través del contacto físico directo.

En otro ejemplo, los productos de tratamiento de tejidos pueden usarse como rellenos de tejido al implantarlos después de la extracción de mucho tejido blando de un paciente, por ejemplo, la extracción de un tumor. Se ha demostrado que después de la extirpación del tumor, la nueva formación de tejido es por lo general pobre, especialmente en cuanto a las capas de tejido subcutáneo. Por lo general, una capa de piel volverá a crecer después de la extirpación del tumor, pero el tejido subyacente permanece sin regenerarse. Por lo tanto, en diversas realizaciones, los productos de tratamiento de tejidos pueden usarse como implantes para reemplazar mucho tejido blando después de la extracción del tumor. En ciertas realizaciones, este tipo de implantes sirven como rellenos de tejido que pueden proporcionar integridad estructural al tejido restante en el sitio del implante. En ciertas realizaciones, donde se extrae mucho tejido cerca de la piel o que la incluye, la implantación de un producto de tratamiento de tejidos puede proporcionar al sitio del implante un aspecto y/o sensación más natural después de la extracción del tumor. En diversas realizaciones, el producto implantado también puede proporcionar una estructura para la migración, proliferación y revascularización del tejido nativo. Además, en ciertas realizaciones, los agentes quelantes, metales y/o proteínas de unión a metal en productos de tratamiento de tejidos pueden ser suministrados directamente al tejido nativo circundante después de la implantación a través del

contacto físico directo.

5 En otro ejemplo más, los productos de tratamiento de tejidos pueden usarse con fines estéticos, por ejemplo, como implantes o en combinación con implantes tradicionales. Por ejemplo, los productos de tratamiento de tejidos pueden usarse para apoyar los implantes mamarios tradicionales, por ejemplo, para el aumento y/o la reconstrucción mamaria. Por ejemplo, un producto de tratamiento de tejidos puede colocarse alrededor de un implante mamario y usarse para llenar el espacio entre el implante y el tejido nativo circundante, y de este modo proporcionar un contorno más liso y/o un aspecto más natural para el implante. Al mismo tiempo, en ciertas realizaciones, el producto de tratamiento de tejidos implantado puede proporcionar una estructura en la que las células del tejido nativo que rodean el implante mamario puedan crecer y proliferar, y de este modo asegurar más firmemente el implante mamario en su lugar y/o reducir la cantidad de fibrosis indeseable que se desarrolla alrededor del implante. Además, en ciertas realizaciones, los agentes quelantes, los metales y/o las proteínas de unión a metal en los productos de tratamiento de tejidos pueden ser 10 suministrados directamente al tejido nativo circundante después de la implantación por contacto físico directo.

## Ejemplos

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar, y de manera alguna limitar, la presente divulgación.

### Ejemplo 1: Actividad antimicrobiana de la dermis acelular tratada con lisostafino

Se incubaron muestras de tejido dérmico porcino acelular (1,5cm x 1,5cm) con lisostafina en una solución salina en las concentraciones ( $\mu\text{g/ml}$ ) indicadas en la Fig. 2 durante 3 horas a temperatura ambiente. Las muestras de tejido se enjuagaron a continuación con solución salina y se colocaron en una placa de agar de soja tríptico. Se inoculó en el tejido una solución que contiene alrededor de  $1\text{e}^6$  células de *S. Aureus*, que fueron incubadas durante la noche a  $37^\circ\text{C}$ . A la mañana siguiente, se determinó la concentración bacteriana (UFC) en cada muestra de tejido después de la extracción y la dilución en serie de las bacterias que crecen en las muestras de tejido. La Fig. 2 muestra que la actividad antimicrobiana, como se indica a través de una reducción en la UFC bacteriana, se logró al usarse concentraciones de lisostafina de  $10\mu\text{g/ml}$  o más.

### Ejemplo 2: Actividad antimicrobiana de la lisostafina inmovilizada con zinc

Se incubaron muestras de  $50\mu\text{l}$  de ácido iminodiacético-agarosa en una solución salina ya sea que contenían zinc o carecían de zinc (control). Las muestras se lavaron a continuación tres veces con solución salina para eliminar el zinc no unido antes de incubar las muestras con soluciones que contenían las concentraciones de lisostafina indicadas en la Tabla 1. Después de la incubación, las muestras se lavaron tres veces con solución salina y se agregaron  $100\text{ml}$  de un cultivo saturado de *S. aureus* a cada muestra. Después de una incubación de 1 hora a temperatura ambiente, se añadió azul Alamar para detectar bacterias viables. Un color rosa indicaba bacterias viables, mientras que el azul indicaba que la mayoría de las bacterias ya no eran viables. Tabla 1.

Tabla 1: Actividad antimicrobiana de lisostafina capturada en Agarosa IDA

Lisostafina	Sin Zinc	Zinc
1ug/ml	Viable	No viable
5ug/ml	Viable	No viable
10ug/ml	Viable	No viable
20ug/ml	Viable	No viable

La Tabla 1 muestra que la actividad antimicrobiana, como lo indica la mayoría de las bacterias no viables en una muestra de agarosa, se logró en muestras tratadas con al menos  $1\mu\text{g/ml}$  de lisostafina.

### Ejemplo 3: Actividad antimicrobiana de la dermis acelular funcionalizada con zinc IDA

Se incubaron muestras de tejido dérmico acelular porcino ( $1\text{cm} \times 1\text{cm}$ ) en presencia de  $1\text{mM}$  de NHS-IDA durante 4 horas. A continuación, se lavaron las muestras con solución salina y se incubaron en una solución de  $1\text{mM}$  de sulfato de zinc. Algunas muestras se enjuagaron en solución salina durante la noche para eliminar el exceso de zinc no unido. Las muestras de tejido se colocaron en una placa de agar de soja tríptico y se inocularon con una solución que contenía alrededor de  $1\text{e}^6$  de células de *S. aureus*. Después de una incubación durante la noche a  $37^\circ\text{C}$ , la concentración bacteriana (UFC) en cada muestra de tejido se determinó después de la extracción y la dilución en serie de las bacterias que crecen en las muestras de tejido. La Fig. 3 muestra que las matrices de tejido dérmico acelular funcionalizadas con zinc e zinc IDA tenían concentraciones bacterianas reducidas, en comparación con las muestras de control y las muestras solo con IDA.

**REIVINDICACIONES**

1. Un producto de tratamiento de tejidos que comprende:

un material poroso que comprende una estructura natural o artificial, en el que el material poroso comprende al menos una matriz extracelular de un tejido parcialmente descelularizado, y una matriz extracelular de un tejido completamente descelularizado; al menos un agente quelante seleccionado del grupo que consiste en ácido iminodiacético (IDA), ácido nitrilotriacético (NTA), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y ácido dietiléntriapentaacético (DTPA) que está covalentemente unido al material poroso; y

en el que el producto de tratamiento de tejidos se funcionaliza con al menos un metal seleccionado del grupo que consiste en calcio, zinc, cobre, plata, cobalto, níquel, manganeso y magnesio unidos al agente o a los agentes quelante(s) en el producto de tratamiento de tejidos.

2. El producto de tratamiento de tejidos de la reivindicación 1, en el que el agente quelante comprende IDA.

3. El producto de tratamiento de tejidos de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el producto de tratamiento de tejidos comprende al menos un derivado de ácido hialurónico, quitosano, policaprolactona, poliglicólido, polilactida, polidioxano, un éster poliéter, poli-(lactida-co-glicólido), o hidroxialconato.

4. El producto de tratamiento de tejidos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el producto de tratamiento de tejidos comprende la matriz extracelular de un tejido parcial o completamente descelularizado seleccionado al menos un tejido de seres humanos, primates no humanos, cerdos, vacas, caballos, cabras, ovejas, perros, gatos, conejos, cobayas, jerbos, hámster, rata y ratón, y/o

en el que del producto de tratamiento de tejidos comprende la matriz extracelular de un tejido parcial o completamente descelularizado seleccionado al menos un tejido de hueso, piel, dermis, intestino, vascular, vejiga urinaria, tendón, ligamento, músculo, fascia, tejido neurológico, vaso, hígado, corazón, pulmón, riñón y tejido cartilaginoso.

5. El producto de tratamiento de tejidos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el producto de tratamiento de tejidos tiene una carga biológica reducida o carece sustancialmente de toda carga biológica.

6. El producto de tratamiento de tejidos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el al menos un agente quelante se une covalentemente a grupos amina, tiol o hidroxilo libres en el material poroso en el producto de tratamiento de tejidos, y/o

en el que el al menos un agente quelante se une covalentemente al material poroso en el producto de tratamiento de tejidos a través de un agente de activación, particularmente en el que el agente de activación es N-hidroxisulfosuccinimida (NHS), Ácido subérico bis (éster de N-hidroxisuccinimida), 1,4-butanodiol diglicidil éter, epibromohidrina o 1,2,7,8-diepoxiocetano.

7. El producto de tratamiento de tejidos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el al menos un metal comprende al menos dos metales.

8. El producto de tratamiento de tejidos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el al menos un metal tiene propiedades antimicrobianas y/o

en el que el al menos un metal tiene la capacidad de interactuar con al menos una proteína de unión a metal, y/o

a) en el que el producto de tratamiento de tejidos se funcionaliza además con al menos una proteína de unión a metal, particularmente

en el que la al menos una proteína de unión a metal tiene propiedades antimicrobianas, particularmente

en el que la al menos una proteína de unión a metal comprende lisostafina,

o

b) en el que la al menos una proteína de unión a metal comprende al menos una metaloproteinasa de matriz, particularmente

en el que la al menos una metaloproteinasa de matriz comprende una colagenasa, gelatinasa, estromolisina, matrilisina o elastasa.

9. El producto de tratamiento de tejidos de la reivindicación 8 b) en el que el agente quelante comprende un material poroso está unido a IDA y funcionalizado con zinc y lisostafina.

10. Un procedimiento de fabricación de un producto de tratamiento de tejidos según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende:

seleccionar un material poroso con una estructura natural o artificial, en el que el material poroso comprenda al menos una matriz extracelular de un tejido parcialmente descelularizado, y una matriz extracelular de un tejido completamente descelularizado;

unir covalentemente al menos un agente quelante al material poroso en el que el al menos un agente quelante comprende al menos uno de IDA, NTA, EDTA o DTPA; y

funcionalizar el producto de tratamiento de tejidos al poner en contacto el producto de tratamiento de tejidos con al menos uno de calcio, zinc, cobre, plata, cobalto, manganeso, níquel y/o magnesio.

5

11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que la unión covalente de al menos un agente quelante al material poroso comprende primero hacer reaccionar el agente quelante con un agente de activación y a continuación unir covalentemente el agente quelante activado a grupos amina, tiol o hidroxilo libres en el material poroso, particularmente

10

en el que el agente de activación es N-hidroxisulfosuccinimida (NHS), ácido subérico bis (éster de N-hidroxisuccinimida), 1,4-butanodiol diglicidil éter, epibromhidrina o 1,2,7,8-diepoxi octano.

12. El procedimiento de la reivindicación 11, que comprende además unir covalentemente un material poroso a IDA y funcionalizar al unir a zinc y lisostafina.

15

13. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, que comprende además poner en contacto el producto de tratamiento de tejidos con una o más células viables, particularmente

en el que la una o más células son células de mamífero, particularmente

en el que la una o más células son células madre.

20

14. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, que comprende además agregar al menos un factor seleccionado de al menos uno de un agente antiinflamatorio, un analgésico, un factor de crecimiento celular, un factor angiogénico, un factor de diferenciación, una citocina, una hormona y una quimiocina al producto de tratamiento de tejidos, particularmente

en el que el al menos un factor está codificado por una secuencia de ácido nucleico contenida dentro de un vector de expresión, particularmente

en el que el vector de expresión está contenido dentro de una o más células viables.

25

15. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, que comprende además irradiar el producto de tratamiento de tejidos, particularmente

en el que irradiar el producto de tratamiento de tejidos comprende exponer el producto de tratamiento de tejidos a irradiación 15-25 kGy E-beam.

30

16. Un producto de tratamiento de tejidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, preparado según el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 10-15.

17. El producto de tratamiento de tejidos de la reivindicación 16 para uso en un procedimiento de tratamiento, que comprende implantar el producto en un tejido que necesite reparación, regeneración, cicatrización, tratamiento o alteración.

35

**Fig. 1A**  
 Síntesis química de IDA funcionalizada

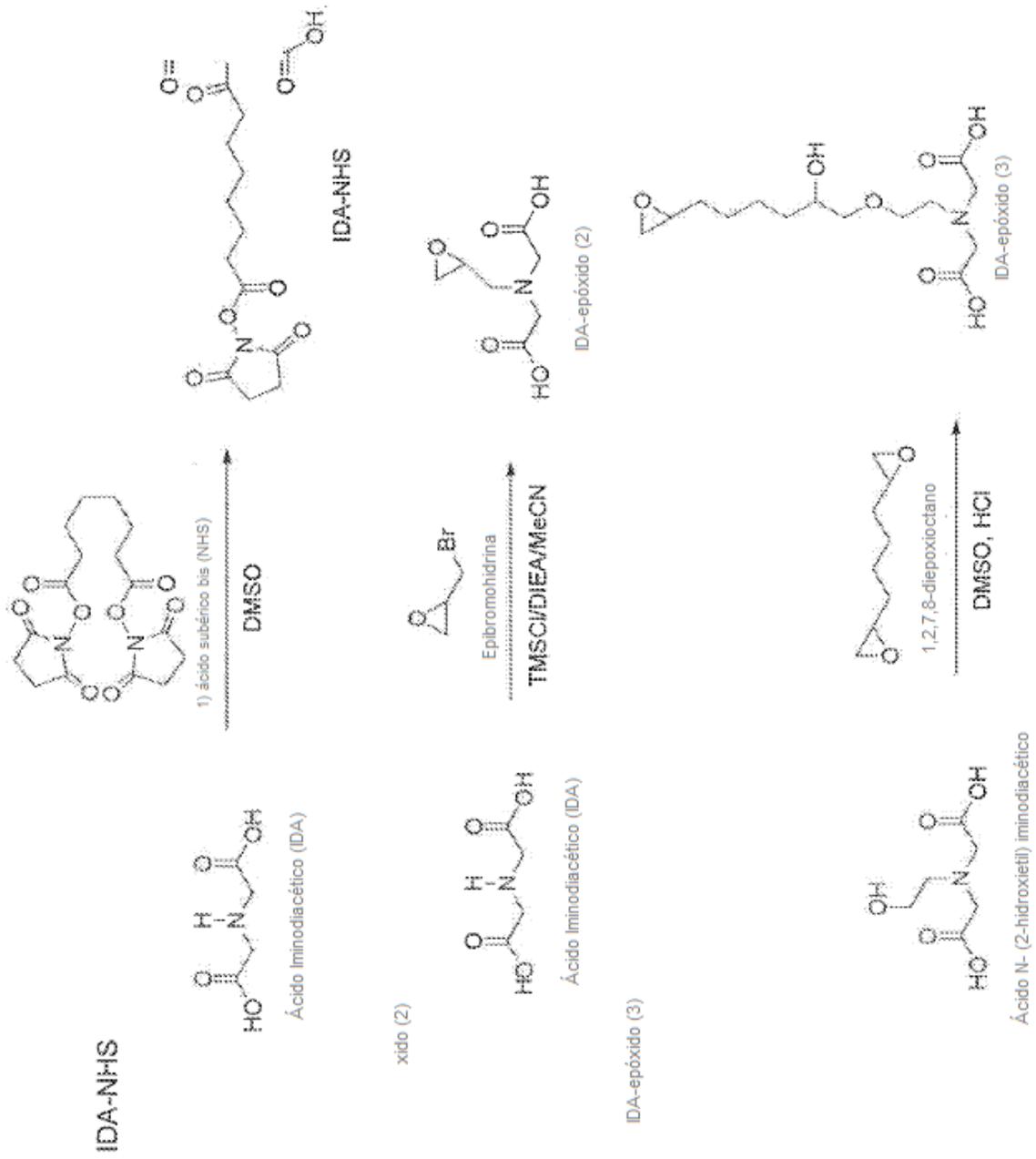


Fig. 1B

Adición de lisostafina a la matriz de tejidos

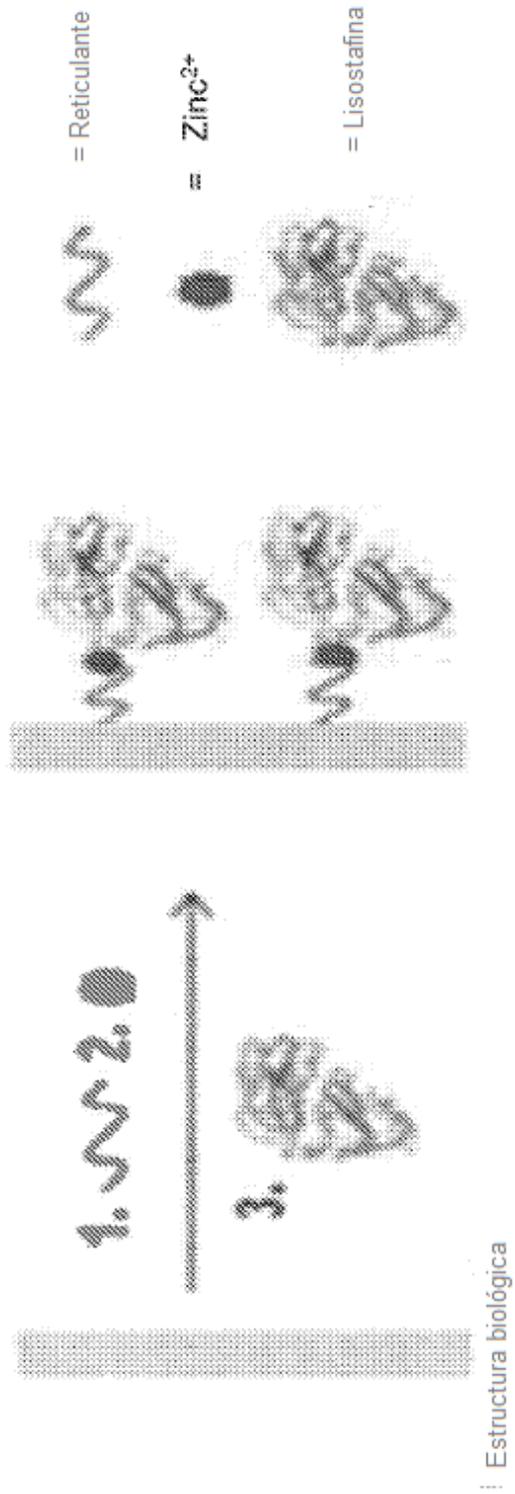


Fig. 2

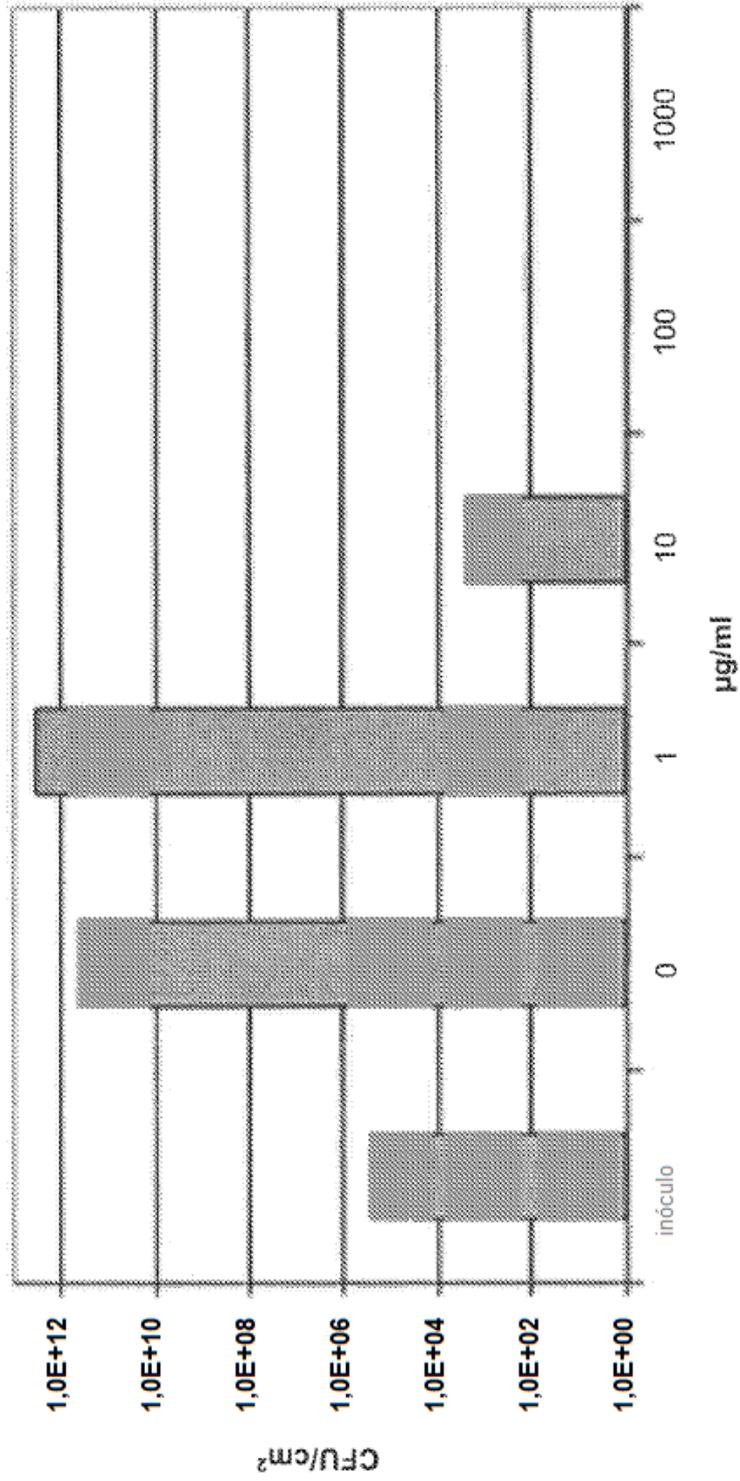


Fig. 3

