

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 755 178**

51 Int. Cl.:

A61L 27/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2009 E 17194586 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 3287151**

54 Título: **Tratamiento de elastasa de matrices tisulares**

30 Prioridad:

06.06.2008 US 59604 P

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

21.04.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

SUN, WENDELL

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 755 178 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

Tratamiento de elastasa de matrices tisulares

5 **Campo**

Esta descripción se refiere a matrices de tejido acelular (ATM) para implantar o injertar a sujetos vertebrados. Más particularmente, la descripción se refiere a la reducción de la capacidad de estiramiento en ATM y a la reducción de las variaciones en la capacidad de estiramiento en un grupo de ATM sin afectar sustancialmente a la integridad estructural o funcional de las ATM.

Antecedentes

Las propiedades mecánicas del tejido implantable o injertable pueden variar mucho. Debido a dichas variaciones, los cirujanos a veces preestiran las matrices tisulares antes de implantar o injertar. Adicionalmente, para la reparación de defectos tisulares particularmente grandes, es posible que haya que suturar juntos múltiples trozos de injertos de tejido. En esos casos, las variaciones en las propiedades mecánicas pueden complicar, por ejemplo, el procedimiento de sutura e implante o injerto.

20 **Resumen**

El alcance de la presente invención se define mediante las reivindicaciones. Cualquiera de las referencias en la descripción para los procedimientos de tratamiento se refieren al grupo de matrices de tejido acelular dérmico modificadas de la presente invención para su uso en un procedimiento para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia.

La presente descripción se refiere a la reducción de la capacidad de estiramiento en ATM y a la reducción de las variaciones en la capacidad de estiramiento en un grupo de ATM sin afectar sustancialmente a la integridad estructural o funcional en las ATM.

En un aspecto, se proporciona un procedimiento de acuerdo con la reivindicación independiente 1. Este procedimiento incluye proporcionar un grupo de matrices de tejido acelular dérmico, y exponer una o más de las ATM del grupo a una solución que contiene una concentración de elastasa durante un período de tiempo. La exposición da como resultado una ATM modificada (mATM) que tiene una capacidad de estiramiento reducida en relación con la ATM. En otras palabras, el porcentaje de extensión (o deformación) de la mATM resultante de una cantidad específica de fuerza de tracción es menor que el porcentaje de extensión (o deformación) de la ATM resultante de la misma cantidad de fuerza de tracción. En algunas implementaciones, el tiempo de exposición y la concentración de elastasa se controlan para obtener una capacidad de estiramiento deseada de la mATM. La capacidad de estiramiento deseada de la mATM puede ser tal que, bajo una fuerza de tracción aplicada de aproximadamente 5 newtons/cm, el porcentaje de extensión de la mATM varía entre el 14 % y el 24 %. Por ejemplo, el porcentaje de extensión de la mATM bajo una fuerza de tracción de aproximadamente 5 newtons/cm es de aproximadamente el 19 %. En algunas implementaciones, la concentración de elastasa está entre aproximadamente 0,1 unidades/mililitro y 0,5 unidades/mililitro o está entre aproximadamente 0,2 unidades/mililitro y 0,25 unidades/mililitro. El tiempo de exposición a la elastasa típicamente está entre aproximadamente 12 y 24 horas y también típicamente es de al menos 18 horas. Ciertas realizaciones del procedimiento incluyen agitar la ATM y la solución durante la exposición. Dicha agitación puede ser suave o más intensa. La agitación puede implementarse agitando constantemente el recipiente que contiene el tejido y la solución de elastasa o volteando el recipiente una y otra vez. La velocidad y la amplitud de agitación pueden variar, al igual que la velocidad a la que se voltea el recipiente.

De acuerdo con la presente invención, el grupo de matrices de tejido acelular son matrices de tejido acelular dérmico.

Otro aspecto incluye una matriz de tejido acelular modificada preparada mediante cualquiera de los procedimientos anteriores.

El procedimiento de acuerdo con la invención reivindicada incluye proporcionar un grupo de matrices de tejido acelular (ATM) dérmico, donde al aplicar una cantidad igual de fuerza de tracción a cada una de las ATM en el grupo, al menos algunas de las ATM en el grupo tienen una capacidad de estiramiento diferente (porcentaje de extensión) que otras ATM en el grupo, exponiendo una o más de las ATM a elastasa durante un período de tiempo. La elastasa está en forma de una solución que contiene una concentración de elastasa. La exposición a elastasa da como resultado una o más ATM modificadas (mATM). La una o más de las mATM son menos elásticas que sus respectivas ATM correspondientes. El porcentaje de extensión de la una o más de las mATM que son resultado de una cantidad de fuerza de tracción es menor que el porcentaje de extensión de sus ATM correspondientes resultantes de la misma cantidad de fuerza de tracción. Adicionalmente, las variaciones en la capacidad de estiramiento de las mATM son menos significativas que las variaciones en la capacidad de estiramiento en las ATM.

En algunas realizaciones, la variación en la capacidad de estiramiento de las mATM es tal que, bajo una fuerza de tracción de aproximadamente 5 newtons/cm, al menos algunas de las mATM se extienden entre aproximadamente el 14% y el 24%. En algunas realizaciones, la variación en la capacidad de estiramiento de las mATM es tal que, bajo una fuerza de tracción de aproximadamente 5 newtons/cm, una pluralidad de las mATM se extiende aproximadamente un 19%.

Ciertas implementaciones incluyen proporcionar una concentración de elastasa entre aproximadamente 0,1 unidades/mililitro y 0,5 unidades/mililitro o entre aproximadamente 0,2 unidades/mililitro y 0,25 unidades/mililitro. El tiempo de exposición, típicamente, es entre aproximadamente 12 y 24 horas y, típicamente, es al menos aproximadamente 18 horas.

En algunas implementaciones, la una o más ATM del grupo se agitan cuando se exponen a la solución.

Las ATM incluyen matrices de tejido acelular dérmico.

Aún otro aspecto incluye un grupo de matrices de tejido acelular modificadas tratadas de acuerdo con lo anterior.

Todavía otro aspecto incluye un procedimiento que incluye proporcionar un grupo de matrices de tejido acelular (ATM), donde al menos algunas de las ATM en el grupo tienen una capacidad de estiramiento diferente de otras ATM en el grupo y exponer una o más ATM del grupo a elastasa (por ejemplo, una solución que contiene una concentración de elastasa) durante un período de tiempo, dando como resultado la exposición a una o más ATM modificadas (mATM), donde una o más de las mATM son menos elásticas que sus respectivas ATM correspondientes. El procedimiento incluye además identificar un sujeto vertebrado que tiene un órgano o tejido que necesita reparación o mejora y colocar la mATM en o sobre el tejido u órgano.

Además, otro aspecto incluye una matriz de tejido acelular modificada (mATM) que incluye una red de elastina y una matriz de colágeno, donde la red de elastina se ha alterado de manera que la capacidad de estiramiento de la mATM sea tal que, bajo una fuerza de tracción aplicada de aproximadamente 5 newtons/cm, la mATM se extienda entre aproximadamente el 14% y el 24% y donde la red de colágeno esté sustancialmente intacta. En ciertas implementaciones, la red de colágeno no incluye reticulación.

En una implementación típica, la red de elastina del tejido se altera suficientemente de manera que la capacidad de estiramiento de la mATM sea tal que, bajo una fuerza de tracción aplicada de aproximadamente 5 newtons/cm, la mATM se extienda entre aproximadamente el 14% y el 24% y la red de colágeno de la mATM esté sustancialmente intacta. En algunas realizaciones, la red de colágeno de la mATM tiene características sustancialmente similares a la red de colágeno de la ATM. Por ejemplo, las propiedades histológicas, térmicas y materiales de la mATM son similares a las de la ATM.

Los tejidos que tienen una capacidad de estiramiento excesiva se pueden tratar para obtener tejidos que tienen solamente un nivel de capacidad de estiramiento deseado particular. Adicionalmente, las variaciones en la capacidad de estiramiento entre muestras de tejido pueden verse reducidas. Esto puede ser particularmente útil en procedimientos que requieren unir más de un trozo de tejido para reparar y/o mejorar un tejido u órgano. Se puede realizar la uniformidad de la capacidad de estiramiento de la muestra de tejido.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece la presente descripción. En caso de conflicto, prevalecerá el presente documento, incluidas las definiciones. Los procedimientos y materiales preferidos se describen a continuación, aunque se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o prueba de la presente descripción. Los materiales, procedimientos y ejemplos descritos en el presente documento son solamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Otras características y ventajas de la presente descripción serán evidentes a partir de la siguiente descripción, de los dibujos y de las reivindicaciones y cláusulas.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es un gráfico de líneas que muestra un diagrama de tensión-deformación de una muestra de tejido típica totalmente hidratada.

La FIG. 2 es un diagrama de flujo de un procedimiento para tratar una matriz de tejido acelular (ATM) con elastasa y colocar la ATM tratada en o sobre un órgano o tejido.

La FIG. 3 es un gráfico de dispersión que muestra el porcentaje de extensión que experimentaron diversas muestras de tejido tratadas con elastasa o no tratadas de aproximadamente un centímetro de longitud cuando se sometieron a una fuerza externa de 5 newtons ("5 N").

Las FIGS. 4A y 4B son fotomicrografías que muestran muestras teñidas para una muestra de tejido no tratada y tratada con elastasa, respectivamente, donde la tinción indica el contenido de elastina de las muestras de tejido.

La FIG. 5 es un gráfico de barras que muestra el porcentaje de aumento en el área que experimentaron diversas muestras de tejido cuando se sometieron al tratamiento con elastasa.

La FIG. 6 es una fotografía que muestra una muestra de tejido arterial no tratada y una muestra de tejido tratada con elastasa junto a una porción de una regla.

La FIG. 7 es una serie de fotografías que muestra una serie de muestras teñidas con Verhoeffs para muestras de tejido no tratadas (ALLODERM® regular) y tratadas con elastasa.

La FIG. 8 es una serie de fotomicrografías que muestran muestras de tejido teñidas con azul Alcian para muestras de tejido no tratadas (ALLODERM® regular) y tratadas con elastasa.

La FIG. 9 es un gráfico de líneas que muestra el flujo de calor frente a la temperatura para muestras de tejido no tratadas y tratadas con elastasa.

Las FIGS. 10A y 10B son gráficos que muestran los cambios de área de dos muestras de tejido sometidas a tratamiento con elastasa a lo largo del tiempo.

Descripción detallada

La presente descripción se refiere a matrices de tejido acelular (ATM) que pueden implantarse o injertarse en, por ejemplo, sujetos vertebrados. Más particularmente, esta descripción se refiere a la producción de ATM modificadas (mATM) que tienen una capacidad de estiramiento reducida con respecto a sus ATM correspondientes, sin comprometer sustancialmente la integridad estructural o funcional asociada del tejido. Adicionalmente, la descripción se refiere a la producción de un grupo de mATM a partir de un grupo de ATM, donde la capacidad de estiramiento de los tejidos en el grupo de mATM tiene menos variación que la capacidad de estiramiento de los tejidos en el grupo de ATM. En otras palabras, el porcentaje de extensión de los tejidos en el grupo de las mATM bajo una cantidad específica de fuerza de tracción tiene menos variación que el porcentaje de extensión de los tejidos en el grupo de las ATM bajo la misma cantidad de fuerza de tracción.

Como se usa en el presente documento, la expresión "capacidad de estiramiento" se refiere generalmente a la capacidad del tejido o de la matriz tisular para estirarse o expandirse bajo una tensión de tracción aplicada. La FIG. 1 representa una curva de tensión-deformación típica para una matriz tisular de dermis completamente hidratada. La ordenada representa la tensión de tracción en megapascales ("MPa") y la abscisa representa la deformación por tracción. La "tensión de tracción" se define como $S = F/A_0$, donde F es la fuerza de tracción, y A_0 es el área en sección transversal de la muestra de ensayo. La "deformación por tracción" se define como $(L_f - L_0)/L_0$ (es decir, $\Delta L/L_0$), donde L_0 es la longitud original de la matriz tisular, L_f es la longitud de la matriz tisular bajo una tensión de tracción, y ΔL es el cambio de longitud que experimenta la matriz tisular (es decir, $L_f - L_0 = \Delta L$). Además, como se usa en el presente documento, "porcentaje de extensión" se define como $(L_f - L_0)/L_0 \times 100\%$ (es decir, $\Delta L/L_0 \times 100\%$) y, por lo tanto, se usa de forma intercambiable con la expresión "deformación por tracción" a lo largo de toda la memoria descriptiva.

La relación no lineal indicada, típica de muchos tejidos blandos, consiste en tres fases de respuesta a la tracción bien definidas. La primera fase es la región inicial; la segunda fase corresponde a la extensión de fibrillas de colágeno bajo tensión; y la última fase es el resultado del límite elástico y la rotura final del material tisular. La capacidad de estiramiento del tejido puede representarse por la longitud de la región inicial, que se determina mediante la extrapolación de la segunda fase de la curva para interceptar el eje x. Esto se puede hacer matemáticamente usando la ecuación lineal $y = a + bx$. La intersección del eje x es $-a/b$.

Como alternativa, se proporciona la comparación entre la deformación por tracción (o porcentaje de extensión) de mATM y ATM bajo una pequeña fuerza de aproximadamente 5 newtons/cm como un procedimiento para comparar la capacidad de estiramiento de mATM y ATM.

Como se usa en el presente documento, una ATM o tejido "totalmente hidratado" es una ATM o tejido que contiene la cantidad máxima de agua unida y no unida que es posible que esa ATM o tejido contenga a presión atmosférica. Al comparar las cantidades de agua (sin unir y/o unida) en dos o más ATM que están completamente hidratadas, dado que la cantidad máxima de agua de una ATM fabricada a partir de un tejido en particular variará con la temperatura de la ATM, es por supuesto importante que las mediciones para las dos (o más) ATM se realicen a la misma temperatura. Los ejemplos de ATM totalmente hidratada incluyen, sin limitación, aquellas al final del procedimiento de descelularización descrito en el Ejemplo 1 y una ATM que se ha rehidratado a temperatura ambiente (es decir, de aproximadamente 15°C a aproximadamente 35°C) en una solución al 0,9 % de cloruro de sodio durante 4 horas tras un procedimiento anterior de liofilización tal como los descritos en el presente documento. El agua unida en una ATM es el agua en la ATM cuya movilidad molecular (rotacional y traslacional) se reduce (en comparación con agua voluminosa pura) debido a interacciones moleculares (por ejemplo, enlace de hidrógeno) entre las moléculas de agua y ATM y/u otros fenómenos (por ejemplo, tensión superficial y restricción geométrica) que limitan la movilidad del agua en la ATM. El agua no unida dentro de la ATM tiene las mismas propiedades de movilidad molecular que el agua voluminosa en soluciones diluidas tales como, por ejemplo, fluidos biológicos. Como se usa en el presente documento, una ATM "parcialmente hidratada" es una ATM que contiene, a presión atmosférica, menos del 100%, pero más del 30% (por ejemplo, más del: 35%; 40%; 45%; 50%; 55%; 60%;

65%; 70%; 75%; 80%; 85%; 90%; 95%; 97%; 98%; o del 99%) del agua no unida y/o unida que la misma ATM contendría a presión atmosférica cuando está completamente hidratada; de nuevo, las mediciones de las cantidades de agua en la ATM parcialmente hidratada y parcialmente hidratada se deben hacer a la misma temperatura.

5 La FIG. 2 es un diagrama de flujo que ilustra una implementación de un procedimiento de tratamiento con elastasa. El procedimiento incluye proporcionar 102 una ATM y exponer 104 la ATM al tratamiento con elastasa (analizado a continuación). El tratamiento con elastasa produce 106 una mATM que tiene una capacidad de estiramiento reducida en relación con la ATM. Si, como se muestra en la implementación ilustrada, un órgano o un tejido en un sujeto vertebral ha sido identificado (por ejemplo, por un profesional médico tal como un médico) 108 como en
 10 necesidad de reparación o mejora, entonces la mATM resultante puede colocarse 110 en o sobre el órgano o tejido identificado. Se cree que el tratamiento con elastasa rompe los enlaces peptídicos en la ATM para producir una mATM con una red de elastina alterada. Típicamente, se rompe un número suficiente de enlaces peptídicos para producir cierto grado de capacidad de estiramiento reducida en la mATM con respecto a la ATM. Típicamente, el número de enlaces peptídicos que se rompen es suficiente en la medida en que el porcentaje de extensión (o deformación) de la mATM bajo una cantidad específica de fuerza de tracción es inferior al 95% (por ejemplo, menor del: 95%; 90%; 85%; 80%; 75%; 70%; 65%; 60%; 55%; 50%; 45%; 40%; 35%; 30%; 25%; 20%; 15%; 10%; 5%, o del 2%) del porcentaje de extensión (o deformación) de la ATM bajo la misma cantidad de fuerza de tracción.

20 Como se usa en el presente documento, una "matriz de tejido acelular" ("ATM") es una estructura derivada de tejido que está hecha de cualquiera de una amplia gama de tejidos que contienen colágeno mediante la eliminación de todas, o sustancialmente todas, las células viables y todos los componentes subcelulares detectables y/o restos generados por la muerte de las células. Como se usa en el presente documento, una ATM que carece de "sustancialmente todas las células viables" es una ATM en la que la concentración de células viables es inferior al 1% (por ejemplo, inferior al: 0,1%; 0,01%; 0,001%; 0,0001%; 0,00001%; o al 0,000001%) la del tejido u órgano del
 25 que está hecha la ATM. Como se usa en el presente documento, una "matriz de tejido acelular modificada" ("mATM") es una ATM que se ha sometido a tratamiento con elastasa. Excepto cuando se indique explícitamente lo contrario, las diversas declaraciones en el presente documento con respecto al uso, características, etc. de las ATM se aplican por igual a las mATM.

30 La ATM de la presente descripción puede carecer de una membrana basal epitelial. La membrana basal epitelial es una lámina fina de material extracelular contigua al aspecto basilar de las células epiteliales. Las láminas de células epiteliales agregadas forman un epitelio. Por lo tanto, por ejemplo, el epitelio de la piel se llama epidermis, y la membrana basal epitelial de la piel se encuentra entre la epidermis y la dermis. La membrana basal epitelial es una matriz extracelular especializada que proporciona una función de barrera y una superficie de unión para células de
 35 tipo epitelial. Los componentes únicos de las membranas basales epiteliales incluyen, por ejemplo, laminina, colágeno de tipo VII, y nidógeno.

La organización temporal y espacial única de la membrana basal epitelial la distingue de, por ejemplo, la matriz extracelular dérmica. La presencia de la membrana basal epitelial en una ATM de la presente descripción podría ser desventajosa en el sentido de que la membrana basal epitelial puede contener una diversidad de componentes específicos de especie que provocarían la producción de anticuerpos, y/o se unirían a anticuerpos preformados, en receptores de injerto xenogénicos de la matriz acelular. Además, la membrana basal epitelial puede actuar como barrera para la difusión de células y/o factores solubles (por ejemplo, quimioatrayentes) y a la infiltración celular. Por lo tanto, su presencia en injertos de ATM puede retrasar la formación de nuevo tejido a partir de la matriz de tejido
 45 acelular en un animal receptor. Como se usa en el presente documento, una ATM que "carece sustancialmente" de una membrana basal epitelial es una matriz tisular acelular que contiene menos del 5% (por ejemplo, menos del: 3%; 2%; 1%; 0,5%; 0,25%; 0,1%; 0,01%; 0,001%; o incluso menos del 0,001%) de la membrana basal epitelial poseída por el tejido no procesado correspondiente a partir del cual se obtuvo la matriz de tejido acelular.

50 Las funciones biológicas conservadas por la ATM incluyen el reconocimiento celular y la unión celular, así como la capacidad de soportar la propagación celular, la proliferación celular y la diferenciación celular. Dichas funciones se proporcionan por proteínas colágenas no desnaturalizadas (por ejemplo, colágeno tipo I) y una diversidad de moléculas no colágenas (por ejemplo, proteínas que sirvan como ligandos para moléculas tales como receptores de integrinas, moléculas con alta densidad de carga tales como glucosaminoglicanos (por ejemplo, hialuronano) o proteoglicanos, u otras adhesinas). Las funciones estructurales conservadas por las matrices acelulares útiles incluyen el mantenimiento de la arquitectura histológica, el mantenimiento del conjunto tridimensional de los componentes del tejido y las características físicas tales como resistencia, elasticidad, y durabilidad, porosidad definida y retención de macromoléculas. La eficacia de las funciones biológicas de una ATM puede medirse, por ejemplo, por la capacidad de la ATM para soportar la proliferación celular y es al menos del 50% (por ejemplo, al menos: 50%; 60%; 70%; 80%; 90%; 95%; 98%; 99%; 99.5%; 100%; o más del 100%) de la del tejido u órgano nativo del que está hecha la ATM.

Aunque puede ser, no es necesario que el material de la matriz injertada esté hecho de un tejido u órgano que sea idéntico al tejido u órgano huésped circundante, sino que simplemente debería ser susceptible de ser remodelado por células invasoras o infiltrantes tales como células diferenciadas del tejido huésped relevante, células madre, tales como células madre mesenquimales, o células progenitoras. La remodelación está dirigida por los

componentes de ATM y las señales que se han descrito anteriormente del tejido huésped circundante (tales como citocinas, componentes de la matriz extracelular, estímulos biomecánicos, y estímulos bioeléctricos). La presencia de células madre mesenquimales en la médula ósea y la circulación periférica se ha documentado en la bibliografía y se ha demostrado que regenera una diversidad de tejidos musculoesqueléticos [Caplan (1991) J. Orthop. Res. 9:641-650; Caplan (1994) Clin. Plast. Surg. 21:429-435; y Caplan et al. (1997) Clin Orthop. 342:254-269]. Además, el injerto debería aportar cierto grado (superior al valor umbral) de resistencia a la tracción y resistencia biomecánica durante el procedimiento de remodelación.

De acuerdo con la presente invención, las ATM se producen a partir de la dermis. Además, los tejidos en o sobre los que se pone la ATM incluyen esencialmente cualquier tejido que pueda ser remodelado por células invasoras o infiltrantes. Los tejidos relevantes incluyen, sin limitación, tejidos esqueléticos tales como hueso, cartílago (por ejemplo, cartílago articular), ligamentos, fascia y tendón. Otros tejidos en los que se puede colocar cualquiera de los aloinjertos anteriores incluyen, sin limitación, piel, encía, duramadre, miocardio, tejido vascular, tejido neural, músculo estriado, músculo liso, pared de la vejiga, tejido de uréter, intestino y tejido de uretra.

Además, aunque una ATM generalmente se habrá fabricado a partir de uno o más individuos de la misma especie que el receptor del injerto de ATM, este no es necesariamente el caso. Por lo tanto, por ejemplo, se puede haber fabricado una ATM a partir de un tejido porcino y se puede implantar en un paciente humano. Las especies que pueden servir como receptores de ATM y donantes de tejidos u órganos para la producción de la ATM incluyen, sin limitación, seres humanos, primates no humanos (por ejemplo, monos, mandriles o chimpancés), porcinos, bovinos, equinos, caprinos, ovejas, perros, gatos, conejos, cobayas, jerbos, hámsters, ratas o ratones. Por ejemplo, los donantes pueden ser animales (por ejemplo, cerdos) que han sido modificados genéticamente para que carezcan del resto galactosa- α -1,3 galactosa terminal. Para descripciones de los animales apropiados véase la solicitud de Estados Unidos N.º de Ser. 10/896.594 en tramitación con la presente y la Pat. de Estados Unidos N.º 6.166.288.

La forma en que se proporciona la ATM dependerá del tejido u órgano del que se obtiene y de la naturaleza del tejido u órgano receptor, así como de la naturaleza del daño o defecto en el tejido u órgano receptor. Por lo tanto, por ejemplo, una matriz derivada de una válvula cardíaca puede proporcionarse como una válvula completa, como pequeñas láminas o tiras, como piezas cortadas en cualquiera de una diversidad de formas y/o tamaños, o en forma de partículas. El mismo concepto se aplica a la ATM producida a partir de cualquiera de los tejidos y órganos enumerados anteriormente.

La ATM puede producirse por una diversidad de procedimientos. Todo lo que se requiere es que las etapas usadas en su producción den como resultado matrices con las propiedades biológicas y estructurales descritas anteriormente. Los procedimientos de producción útiles incluyen los descritos en las Pat. de Estados Unidos N.º 4.865.871 y 5.366.616 y la solicitud de Estados Unidos n.º de Ser. N. 09/762.174, 10/165.790, y 10/896.594 en tramitación con la presente.

Brevemente, las etapas implicadas en la producción de una ATM generalmente incluyen recoger el tejido de un donante (por ejemplo, un cadáver humano o cualquiera de los mamíferos enumerados anteriormente), un tratamiento químico para estabilizar el tejido y evitar degradación bioquímica y estructural, junto con o seguido de la eliminación celular en condiciones que, de manera similar, conservan la función biológica y estructural. Después de la eliminación completa de los componentes celulares muertos y/o lisados que pueden causar inflamación, así como cualquier agente de eliminación celular bioincompatible, la matriz puede someterse al procedimiento de tratamiento con elastasa de la presente descripción. Como alternativa, la ATM puede tratarse con un agente de crioconservación y crioconservarse y, opcionalmente, liofilizarse, de nuevo bajo las condiciones necesarias para mantener las propiedades biológicas y estructurales descritas de la matriz. Después de la liofilización, el tejido puede, opcionalmente, pulverizarse o micronizarse para producir una ATM en partículas en condiciones de conservación de función similares. Después de la crioconservación o la liofilización (y opcionalmente pulverización o micronización), la ATM puede descongelarse o rehidratarse, respectivamente, y luego someterse al procedimiento de tratamiento con elastasa de la presente descripción. En general, todas las etapas se realizan en condiciones asépticas o estériles.

La solución estabilizante inicial detiene e impide la degradación osmótica, hipóxica, autolítica y proteolítica, protege frente a la contaminación microbiana, y reduce el daño mecánico que se puede producir con tejidos que contengan, por ejemplo, componentes del músculo liso (por ejemplo, vasos sanguíneos). La solución estabilizante contiene generalmente un tampón apropiado, uno o más antioxidantes, uno o más agentes oncóticos, uno o más antibióticos, uno o más inhibidores de proteasas y, en algunos casos, un relajante del músculo liso.

A continuación, el tejido se coloca en una solución de procesamiento para eliminar las células viables (por ejemplo, células epiteliales, células endoteliales, células del músculo liso y fibroblastos) de la matriz estructural sin dañar la integridad biológica y estructural de la matriz de colágeno. La solución de procesamiento contiene generalmente un tampón apropiado, sal, un antibiótico, uno o más detergentes, uno o más agentes para impedir el entrecruzamiento, uno o más inhibidores de proteasas y/o una o más enzimas. El tratamiento del tejido debe realizarse con una solución de procesamiento que contenga agentes activos a una concentración y durante un periodo de tiempo tal que se mantenga la integridad estructural de la matriz.

Después de que el tejido se descelularice, se puede someter al procedimiento de tratamiento con elastasa de la presente descripción o se puede crioconservar como se describe a continuación.

5 Como alternativa, el tejido puede crioconservarse antes de someterse al tratamiento con elastasa. Si es así, después de la descelularización, el tejido se incuba en una solución de crioconservación. Esta solución generalmente contiene uno o más crioprotectores para minimizar el daño del cristal de hielo a la matriz estructural que podría ocurrir durante la congelación. Si el tejido va a liofilizarse, la solución generalmente también contendrá uno o más componentes de protección en seco, para minimizar el daño estructural durante el secado, que puede
10 incluir una combinación de un disolvente orgánico y agua que no experimenta expansión o contracción durante la congelación. Los agentes crioprotectores y de protección en seco pueden ser la misma sustancia o más. Si el tejido no va a liofilizarse, puede congelarse colocándolo (en un recipiente esterilizado) en un congelador a aproximadamente -80°C, o sumergiéndolo en nitrógeno líquido estéril, y luego almacenándolo a una temperatura por debajo de -160°C hasta su uso. La muestra puede descongelarse antes de su uso, por ejemplo, sumergiendo un
15 recipiente estéril no permeable (véase a continuación) que contiene un baño de agua a aproximadamente 37°C, o permitiendo que el tejido llegue a temperatura ambiente en condiciones ambientales.

Si el tejido debe congelarse y liofilizarse, después de la incubación en la solución de crioconservación, el tejido se envasa dentro de un recipiente estéril que es permeable al vapor de agua, pero impermeable a las bacterias, por
20 ejemplo, una bolsa permeable al vapor de agua o vial de vidrio. Un lado de una bolsa adecuada consiste en una membrana TYVEK® porosa de calidad médica, un producto registrado de DuPont Company of Wilmington, Del. Esta membrana es porosa al vapor de agua e impermeable a las bacterias y el polvo. La membrana TYVEK® está termosellada a una lámina laminada de polietileno impermeable, dejando un lado abierto, formando así una bolsa de dos lados. La bolsa abierta se esteriliza mediante irradiación (por ejemplo, irradiación gamma) antes de su uso. El
25 tejido se coloca asépticamente (a través del lado abierto) en la bolsa estéril. El lado abierto se termosella entonces asépticamente para cerrar la bolsa. El tejido empaquetado está protegido a partir de ahora de la contaminación microbiana a lo largo de las etapas de procesamiento posteriores.

El recipiente que contiene el tejido se enfría a baja temperatura a una velocidad especificada que es compatible con
30 la formulación crioprotectora específica para minimizar el daño por congelación. Véase la Pat. de Estados Unidos N.º 5.336.616 para ejemplos de protocolos de enfriamiento apropiados. El tejido se seca después a baja temperatura en condiciones de vacío, de tal forma que el vapor de agua se elimina secuencialmente de cada fase de cristal de hielo.

Al finalizar el secado de las muestras en el recipiente permeable al vapor de agua, el vacío del aparato de liofilización se invierte con un gas inerte seco tal como nitrógeno, helio o argón. Mientras se mantiene en el mismo
35 entorno gaseoso, el recipiente semipermeable se coloca dentro de un recipiente impermeable (es decir, impermeable al vapor de agua, así como a los microorganismos) (por ejemplo, una bolsa), que se sella adicionalmente, por ejemplo, mediante calor y/o presión. Cuando la muestra de tejido se congeló y se secó en un vial de vidrio, el vial se selló al vacío con un tapón inerte apropiado, y el vacío del aparato de secado se invirtió con un gas inerte antes de la descarga. En cualquier caso, el producto final está sellado herméticamente en una
40 atmósfera gaseosa inerte. El tejido liofilizado se puede almacenar en condiciones de refrigeración hasta que se trate con elastasa.

Después de la rehidratación de la ATM tratada con elastasa como se describe a continuación, las células viables
45 histocompatibles pueden restaurarse en la ATM para producir un injerto aceptado permanentemente que puede ser remodelado por el huésped. Esto generalmente se hace justo antes de colocar la ATM en un sujeto mamífero. Cuando la matriz se ha liofilizado, se realizará después de la rehidratación. En una realización, las células viables e histocompatibles se pueden añadir a las matrices mediante técnicas estándar de cultivo celular *in vitro* antes de su trasplante, o mediante repoblación *in vivo* después de su trasplante. La repoblación *in vivo* puede ser por las propias células del receptor que migran a la ATM o por la infusión o inyección de células obtenidas del receptor o células
50 histocompatibles de otro donante en la ATM *in situ*.

Los tipos de células usadas para la reconstitución dependerán de la naturaleza del tejido u órgano para el que se está remodelando la ATM. Por ejemplo, el requisito principal para la reconstitución de la piel de espesor total con
55 una ATM es la restauración de las células epidérmicas o los queratinocitos. Por ejemplo, las células derivadas directamente del receptor deseado pueden usarse para reconstituir una ATM, y la composición resultante puede injertarse en el receptor en forma de un injerto de piel dividida mallada. Como alternativa, se pueden añadir células cultivadas (autólogas o alogénicas) a la ATM. Dichas células pueden crecer, por ejemplo, en condiciones de cultivo tisular estándar y después añadirse a la ATM. En otra realización, las células pueden crecer en y/o sobre una ATM
60 en cultivo tisular. Las células cultivadas en y/o sobre una ATM en cultivo tisular se pueden haber obtenido directamente de un donante apropiado (por ejemplo, el receptor deseado o un donante alogénico), o se pueden haber hecho crecer primero en cultivo tisular en ausencia de la ATM.

La célula más importante para la reconstitución de válvulas cardíacas y conductos vasculares es la célula endotelial,
65 que recubre la superficie interna del tejido. Las células endoteliales también se pueden expandir en cultivo y se pueden derivar directamente del paciente receptor deseado o de arterias o venas umbilicales.

Otras células con las que pueden repoblarse las matrices incluyen, pero sin limitación, fibroblastos, células madre embrionarias (ESC), células madre mesenquimales adultas o embrionarias (MSC), procondroblastos, condroblastos, condrocitos, proosteoblastos, osteocitos, osteoclastos, monocitos, procarionioblastos, pericitos, cardiomioblastos, cardiomiocitos, células epiteliales gingivales, o células madre del ligamento periodontal. Naturalmente, la ATM puede repoblarse con combinaciones de dos más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez) de estos tipos de células.

Los reactivos y los procedimientos para realizar todas las etapas anteriores se conocen en la técnica. Los reactivos y los procedimientos adecuados se describen, por ejemplo, en la Pat. de Estados Unidos N.º 5.336.616.

La ATM particulada puede fabricarse a partir de cualquiera de las ATM no particuladas descritas anteriormente mediante cualquier procedimiento que dé como resultado la conservación de las funciones biológicas y estructurales descritas anteriormente, y el daño a las fibras de colágeno, incluyendo los extremos de fibras cizalladas, debe minimizarse. Muchos procedimientos conocidos de humectación y secado para fabricar la ATM particulada no conservan la integridad estructural de las fibras de colágeno.

Se describe un procedimiento apropiado para fabricar la ATM particulada en la Patente de Estados Unidos N.º 6.933.326.

La matriz dérmica acelular se puede cortar en tiras (usando, por ejemplo, un mallador Zimmer equipado con una rueda de corte "continua" sin interrupción). Las tiras largas resultantes se cortan entonces en longitudes de aproximadamente 1 cm a aproximadamente 2 cm. Un homogeneizador y una sonda homogeneizadora esterilizada (por ejemplo, un homogeneizador LabTeck Macro disponible en OMNI International, Warrenton, Va) se ensamblan y se enfrían a temperaturas criogénicas (es decir, de aproximadamente -196°C a aproximadamente -160°C) usando nitrógeno líquido estéril que se vierte en la torre del homogeneizador. Una vez que el homogeneizador ha alcanzado una temperatura criogénica, se añaden trozos de ATM a la torre de homogeneización que contiene el nitrógeno líquido. El homogeneizador se activa entonces para fracturar criogénicamente los trozos de ATM. El tiempo y la duración de la etapa de fracturación criogénica dependerán del homogeneizador utilizado, el tamaño de la cámara de homogeneización, y la velocidad y el tiempo de funcionamiento del homogeneizador. Como alternativa, el procedimiento de criofracturación puede realizarse en un cryomill enfriado a una temperatura criogénica.

La matriz de tejido acelular particulada crio-fracturada se clasifica, opcionalmente, por tamaño de partícula lavando el producto de la homogeneización con nitrógeno líquido estéril a través de una serie de cribas de metal que también se han enfriado a una temperatura criogénica. En general, es útil eliminar partículas grandes no deseadas con una criba con un tamaño de poro relativamente grande antes de proceder con una o más cribas con un tamaño de poro más pequeño. Una vez aisladas, las partículas se pueden liofilizar para asegurar que se elimine toda la humedad residual que pueda haber sido absorbida durante el procedimiento. El producto final es un polvo (usualmente de color blanco o blanquecino), que generalmente tiene un tamaño de partícula en su dimensión más larga de aproximadamente 1 micrómetro a aproximadamente 900 micrómetros, de aproximadamente 30 micrómetros a aproximadamente 750 micrómetros, o de aproximadamente 150 a aproximadamente 300 micrómetros. El material se rehidrata fácilmente mediante suspensión en solución salina normal o cualquier otro agente rehidratante adecuado conocido en la técnica. También puede suspenderse en cualquier vehículo adecuado conocido en la técnica (véase, por ejemplo, la Pat. de Estados Unidos N.º 5.284.655). Si se suspende a una concentración alta (por ejemplo, a aproximadamente 600 mg/ml), la ATM particulada puede formar una "masilla", y si se suspende a una concentración algo menor (por ejemplo, aproximadamente 330 mg/ml), puede formar una "pasta". Dichas masillas y pastas pueden cargarse convenientemente en, por ejemplo, orificios, huecos, o espacios de cualquier forma en tejidos y órganos para llenar sustancialmente dichos orificios, huecos o espacios.

Se produce una ATM liofilizada muy adecuada a partir de dermis humana por LifeCell Corporation (Branchburg, N.J.) y se comercializa en forma de pequeñas láminas como ALLODERM®. Dichas láminas son comercializadas por LifeCell Corporation como láminas rectangulares con las dimensiones de, por ejemplo, 1 cm x 2 cm, 3 cm x 7 cm, 4 cm x 8 cm, 5 cm x 10 cm, 4 cm x 12 cm, y 6 cm x 12 cm. El crioprotector utilizado para congelar y secar ALLODERM® es una solución de maltodextrina al 35% y etilendiaminotetraacetato (EDTA) 10 mM. De este modo, el producto seco final contiene aproximadamente el 60% en peso de ATM y aproximadamente el 40% en peso de maltodextrina. LifeCell Corporation también fabrica un producto análogo hecho de dermis porcina (designado XenDerm) que tiene las mismas proporciones de ATM y maltodextrina que ALLODERM®. Además, LifeCell Corporation comercializa una matriz dérmica acelular particulada fabricada por criofracturación de ALLODERM® (como se ha descrito anteriormente) con el nombre de CYMETRA®. El tamaño de partícula para CYMETRA® está en el intervalo de aproximadamente 60 micrómetros a aproximadamente 150 micrómetros, según lo determinado por la masa. Además, otra ATM adecuada es una ATM hidratada producida a partir de dermis porcina, STRATTICE™, también disponible en LifeCell corporation.

Las partículas de ATM particulada o pulverizada (en polvo) de la presente descripción serán menores de 1,0 mm en su dimensión más larga. Los trozos de ATM con dimensiones superiores a esta son matrices acelulares no particuladas.

Tratamiento con elastasa

La expresión "tratamiento con elastasa", como se usa en el presente documento, se refiere generalmente a exponer una muestra (o muestras) de tejido a elastasa de una manera que altera la red de elastasa del tejido reduciendo así la capacidad de estiramiento de la muestra o muestras de tejido. El tratamiento con elastasa se realiza típicamente en cualquier momento después (por ejemplo, inmediatamente después, horas después o días después) de que se haya descelularizado una muestra de tejido. Como se ha indicado anteriormente, también se puede realizar en tejidos que se han descelularizado y luego se han almacenado congelados o liofilizados durante largos períodos de tiempo (por ejemplo, varias semanas, meses o incluso años).

La elastasa se puede obtener de cualquiera de una amplia diversidad de fuentes. Por lo tanto, puede obtenerse a partir de fuentes animales (por ejemplo, mamíferos tales como porcinos), plantas o microbianas (por ejemplo, bacterianas). Los ejemplos específicos no limitantes de elastasas que pueden usarse en los procedimientos de la presente descripción son los siguientes:

(a) Elastasa pancreática porcina (Comisión de Enzimas n.º EC 3.4.21.36) (pancreatopeptidasa E), que es una única cadena polipeptídica de 240 residuos de aminoácidos y contiene cuatro puentes disulfuro. Tiene una amplia especificidad, y escindirá las proteínas en el lado carboxilo de los aminoácidos hidrófobos pequeños tales como Ile, Gly, Ala, Ser, Val y Leu. También hidrolizará amidas y ésteres. La elastasa pancreática porcina es única entre las proteasas en su capacidad para hidrolizar la elastina nativa, un sustrato no atacado por tripsina, quimotripsina o pepsina. Al añadir inhibidor de tripsina de soja e inhibidor de calicreína, se suprime su actividad proteolítica, pero no su actividad elastolítica.

(b) Elastasa de neutrófilos humanos (leucocitos) (Comisión de Enzimas n.º EC 3.4.21.37), que también se conoce como elastasa lisosómica, elastasa de neutrófilos, elastasa de leucocitos polimorfonucleares, elastasa de serina, elastasa lisosómica, o elastasa de granulocitos. La serina endoproteasa de 29 kDa existe como una única cadena peptídica de 238 aminoácidos con cuatro enlaces disulfuro, y comparte aproximadamente un 43% de homología de secuencia con la elastasa pancreática porcina. La elastasa de leucocitos escinde preferiblemente en el lado carboxilo de valina, pero también escinde en menor medida después de (es decir, en el lado carboxilo de) la alanina. Además de la elastina, la elastasa de los leucocitos escinde los proteoglicanos del cartílago, los tipos de colágeno I, II, III y IV y la fibronectina.

(c) Metaloproteinasa de matriz humana-12 (MMP-12) (Comisión de Enzimas n.º EC 3.4.24.65). MMP-12 también se conoce como elastasa de macrófagos. Se expresa por un rango más amplio de células que la elastasa de leucocitos humanos y se secreta como una enzima inactiva (zimógeno). El zimógeno se activa eliminando el dominio propeptídico. La MMP-12 degrada la elastina, el colágeno IV, la laminina, la fibronectina, las serpinas tal como el inhibidor de alfa-1 proteinasa, la antiplasmina α -2, y el inhibidor-2 del activador del plasminógeno, pero no los colágenos intersticiales.

(d) Elastasas microbianas tales como elastasa de *Pseudomonas aeruginosa*, que es una metaloproteinasa que hidroliza elastina insoluble, colágenos, inmunoglobulinas, inhibidor de la alfa-1-proteinasa sérica, y alfa-2-macroglobina, laminina y fibrina.

Las elastasas de interés incluyen: (i) polipéptidos maduros de longitud completa, de tipo salvaje; (ii) fragmentos funcionales de (i); (iii) variantes funcionales de (i) e (ii). Como se usa en el presente documento, un "fragmento" de un polipéptido de elastasa es un fragmento de la elastasa madura de longitud completa, de tipo salvaje correspondiente, que es más corta que la correspondiente elastasa madura de longitud completa, de tipo salvaje. Una variante de una elastasa puede ser una elastasa madura, de longitud completa, de tipo salvaje, o un fragmento de una elastasa, que contiene una o más deleciones internas de 1 a 50, 1 a 25, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 8, 1 a 5 o 1 a 3 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, o 50) aminoácidos, adiciones internas o terminales de cualquier número de aminoácidos (por ejemplo, los mismos números dados anteriormente para deleciones internas), o no más de 30 (por ejemplo, no más de: 25; 20; 15; 12; 10; 9; 8; 7; 6; 5; 4; 3; 2; o 1) sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones conservativas. Las sustituciones conservativas incluyen típicamente sustituciones dentro de los siguientes grupos: glicina y alanina; valina, isoleucina y leucina; ácido aspártico y ácido glutámico; asparagina, glutamina, serina y treonina; lisina, histidina y arginina; y fenilalanina y tirosina. Los fragmentos "funcionales" y variantes "funcionales" de una elastasa tienen al menos un 25% (por ejemplo, al menos: 30%; 40%; 50%; 60%; 70%; 80%; 90%; 95%; 97%; 98%; 99%; 99.5%; 100%; o incluso más del 100%) de la actividad elastasa de la elastasa madura de longitud completa, de tipo salvaje correspondiente. Se entiende a partir de lo anterior, que las variantes pueden ser variantes alélicas.

En algunas realizaciones, se pueden incluir inhibidores proteolíticos (por ejemplo, inhibidor de tripsina de soja e inhibidor de calicreína) en los medios que contienen elastasa utilizados para tratar ATM para disminuir su actividad proteolítica amplia no específica, pero retener todo o un nivel sustancial (por ejemplo, >40%, >50%, >60%, >70%, >80%, >90%, >95%, >98%, o >99%) de su actividad proteolítica inespecífica. Además, pueden ser útiles las variantes funcionales de elastasa que, por ejemplo, tienen una actividad proteolítica no específica reducida, pero conservada, mínimamente reducida, o incluso una actividad elastolítica mejorada.

Todos los polipéptidos, fragmentos y variantes de elastasa de tipo salvaje (denominados colectivamente a

continuación como "polipéptidos de elastasa") descritos anteriormente se pueden obtener a partir de cualquier fuente natural relevante mediante procedimientos bioquímicos y químicos estándar. Como alternativa, pueden ser moléculas recombinantes producidas por procedimientos recombinantes estándar que emplean células huésped transformadas (por ejemplo, eucariotas, tales como células de mamíferos, insectos u hongos, incluyendo levaduras, células o células procariotas, tales como células bacterianas). Dichos procedimientos recombinantes se conocen bien en la técnica.

Los polipéptidos de elastasa se pueden usar en una forma en bruto (por ejemplo, como un lisado celular o un homogeneizado tisular), en una forma semipurificada, o en una forma sustancialmente pura. En algunas realizaciones, pueden aislarse. La expresión "polipéptido de elastasa aislado", como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido de elastasa que no tiene homólogo natural o se ha separado o purificado de componentes que lo acompañan naturalmente, por ejemplo, en tejidos tales como páncreas, hígado, bazo, ovario, testículo, músculo, tejido de articulación, tejido neural, tejido gastrointestinal o tejido tumoral; fluidos corporales tales como sangre, suero u orina; o células tales como leucocitos, células monocíticas, células linfocíticas o células microbianas). Típicamente, un polipéptido de elastasa se considera "aislado" cuando carece al menos en un 70%, en peso seco, de las proteínas y otras moléculas orgánicas de origen natural con las que está asociado de forma natural. En diversas realizaciones, una preparación de un polipéptido de elastasa es al menos un 80%, al menos un 90%, o al menos un 99%, en peso seco, del polipéptido de elastasa. Dado que un polipéptido de elastasa que se sintetiza químicamente está, por su naturaleza, separado de los componentes que lo acompañan de forma natural, un polipéptido de elastasa sintético está "aislado". Además, un polipéptido de elastasa, que puede estar presente en medio de cultivo o tampón de incubación (utilizado, por ejemplo, para tratar ATM) debido a su presencia en suero de mamífero (o cualquier otro fluido corporal) que contenga el medio de cultivo o tampón de incubación, no es un polipéptido de elastasa aislado.

Un polipéptido de elastasa aislado útil para realizar los procedimientos de la presente descripción, como se ha indicado anteriormente, puede obtenerse, por ejemplo, mediante extracción de una fuente natural (por ejemplo, de tejidos), mediante la expresión de un ácido nucleico recombinante que codifica el polipéptido; o por síntesis química. Un polipéptido de elastasa que se produce en un sistema celular diferente de la fuente de la que se origina naturalmente está "aislado", ya que necesariamente carecerá de componentes que lo acompañen naturalmente. El grado de aislamiento o pureza se puede medir mediante cualquier procedimiento apropiado, por ejemplo, cromatografía en columna, electroforesis en gel de poliacrilamida, o análisis por HPLC.

En algunas implementaciones, el tratamiento con elastasa se controla de manera que se obtiene un grado deseado de capacidad de estiramiento en la mATM resultante. En esas implementaciones, la capacidad de estiramiento deseada de la mATM resultante puede ser tal que, bajo una fuerza de tracción aplicada de aproximadamente 5 newtons/cm, la mATM se extenderá entre aproximadamente el 14% y el 24%, entre aproximadamente el 15% y el 23%, entre aproximadamente el 16% y el 22%, entre aproximadamente el 17% y el 21%, entre aproximadamente el 18% y el 20%, o aproximadamente el 19%. Como alternativa, la capacidad de estiramiento deseada puede ser tal que, bajo una fuerza de tracción aplicada de aproximadamente 5 newtons/cm, la mATM resultante probablemente no se extenderá más de aproximadamente el 24%, 23%, 22%, 21%, 20% o el 19%.

La producción de una mATM que tenga la capacidad de estiramiento deseada puede implicar controlar, por ejemplo, la duración de la exposición y la concentración de elastasa en la solución a la que está expuesta la muestra o muestras de tejido. La duración de la exposición puede estar entre, por ejemplo, aproximadamente 12 y 24 horas, 13 y 23 horas, 14 y 22 horas, 15 y 21 horas, 16 y 20 horas, 17 y 19 horas o aproximadamente 18 horas. Como alternativa, la duración de la exposición puede ser de al menos 3 horas, 6 horas, 9 horas o 12 horas. Como alternativa, la duración de la exposición puede no ser superior a 30 horas, 18 horas o 9 horas.

La concentración de elastasa en solución puede estar entre aproximadamente 0,1 unidades/mililitro y 0,5 unidades/mililitro o entre aproximadamente 0,2 unidades/mililitro y 0,4 unidades/mililitro. La concentración de elastasa en solución puede ser de aproximadamente 0,2 unidades/mililitro, aproximadamente 0,25 unidades/mililitro o aproximadamente 0,3 unidades/mililitro.

Típicamente, la cantidad de solución de elastasa usada para tratar una o más muestras de tejido es de aproximadamente 3 mililitros por gramo de tejido húmedo. Otras cantidades de solución de elastasa también pueden ser aceptables. Por ejemplo, más de 3 mililitros por gramo de tejido húmedo ciertamente deberían funcionar.

El tratamiento con elastasa se puede realizar a temperatura ambiente. Como se usa en el presente documento, el término "temperatura ambiente" significa temperaturas entre 20-25°C.

Típicamente, la muestra o muestras de tejido y la solución de elastasa se agitan durante al menos parte de, si no toda, la duración de la exposición a elastasa.

Procedimientos de tratamiento

La forma de la ATM o mATM utilizada en cualquier caso particular dependerá del tejido u órgano al que se va a

aplicar.

Las láminas de ATM (opcionalmente cortadas a un tamaño apropiado) pueden estar, por ejemplo: (a) envueltas alrededor de un tejido u órgano que está dañado o que contiene un defecto; (b) situadas sobre la superficie de un tejido u órgano que está dañado o tiene un defecto; o (c) enrolladas e insertadas en una cavidad, hueco, o espacio en el tejido u órgano. Dichas cavidades, huecos o espacios pueden ser, por ejemplo: (i) de origen traumático, (ii) debido a la extirpación de tejido enfermo (por ejemplo, tejido miocárdico infartado), o (iii) debido a la extirpación de tumores malignos o no malignos. La ATM puede usarse para aumentar o mejorar tejidos u órganos subdesarrollados o para aumentar o reconfigurar tejidos u órganos deformados. Una o más de dichas tiras se pueden usar en cualquier sitio en particular. Los injertos se pueden mantener en su lugar mediante, por ejemplo, suturas, grapas, tachuelas o pegamentos o selladores tisulares conocidos en la técnica. Como alternativa, si, por ejemplo, se empaquetan con suficiente fuerza en un defecto o cavidad, es posible que no necesiten ningún dispositivo de seguridad. La ATM particulada puede suspenderse en un vehículo estéril farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, solución salina normal) y puede inyectarse a través de una aguja hipodérmica en un sitio de interés. Como alternativa, la matriz en polvo seco o una suspensión se pueden pulverizar sobre un sitio de interés. Una suspensión también se puede verter en o sobre un sitio particular. Además, mezclando la ATM particulada con una cantidad relativamente pequeña de vehículo líquido, se puede hacer una "masilla". Tal masilla, o incluso una ATM particulada seca, puede acoplarse, empaquetarse o encerrarse en cualquiera de los huecos, cavidades o espacios en órganos o tejidos mencionados anteriormente. Además, se puede usar una ATM no particulada junto con una ATM particulada. Por ejemplo, una cavidad en el hueso puede cargarse con una masilla (como se ha descrito anteriormente) y cubrirse con una lámina de ATM.

Se puede aplicar una ATM a o sobre un tejido u órgano con el fin de reparar o regenerar ese tejido u órgano y/o un tejido u órgano vecino. Por lo tanto, por ejemplo, una tira de ATM puede envolverse alrededor de un defecto de hueso crítico de un hueso largo para generar un equivalente de periostio que rodea el defecto de hueso y el equivalente de periostio puede a su vez estimular la producción de hueso dentro del hueco en el hueso. De manera similar, al implantar una ATM en un alveolo de extracción dental, el tejido de la encía dañado puede repararse y/o reemplazarse y el "nuevo" tejido de la encía puede ayudar a reparar y/o regenerar cualquier hueso en la base del alveolo que pueda haberse perdido como resultado, por ejemplo, de la extracción de dientes. Con respecto al tejido de las encías (gingiva), las encías retraídas también pueden reemplazarse por la inyección de una suspensión, o mediante el empaquetamiento de una masilla de ATM particulada en el tejido de la encía apropiado. De nuevo, además de reparar el tejido gingival, este tratamiento puede dar como resultado la regeneración del hueso perdido como resultado de enfermedad periodontal y/o la extracción de dientes. Las composiciones usadas para tratar cualquiera de los defectos gingivales anteriores pueden contener uno o más componentes diferentes enumerados en el presente documento, por ejemplo, polvo de hueso desmineralizado, factores de crecimiento, o células madre.

Tanto la ATM no particulada como la particulada se pueden usar junto con otros componentes de andamiaje o de soporte físico. Por ejemplo, una o más láminas de ATM pueden estar dispuestas en capas con una o más láminas hechas de un material biológico distinto de ATM, por ejemplo, cartilago irradiado suministrado por un banco de tejidos tal como LifeNet, Virginia Beach, Va., o cuñas óseas y formas suministradas por, por ejemplo, Osteotech Corporation, Edentown, NJ. Como alternativa, dichas láminas distintas de ATM pueden estar fabricadas de materiales sintéticos, por ejemplo, ácido poliglicólico o hidrogeles tal como el suministrado por Biocure, Inc., Atlanta, Ga. Se describen otros materiales de andamiaje o soporte físico adecuados en la Pat. de Estados Unidos N.º 5.885.829. Se entiende que dichos componentes de andamiaje o soporte físico adicionales pueden tener cualquier tamaño o forma conveniente, por ejemplo, láminas, cubos, rectángulos, discos, esferas, o partículas (como se ha descrito anteriormente para la ATM particulada).

Las sustancias activas que pueden mezclarse con ATM particulada o impregnarse en ATM no particulada incluyen polvo de hueso, polvo de hueso desmineralizado, y cualquiera de los descritos anteriormente.

Los factores que pueden incorporarse en las matrices, administrarse al sitio de colocación de un injerto de ATM, o administrarse sistémicamente, incluyen cualquiera de una amplia gama de factores de crecimiento celular, factores angiogénicos, factores de diferenciación, citocinas, hormonas y quimiocinas conocidas en la técnica. Cualquier combinación de dos o más de los factores se puede administrar a un sujeto por cualquiera de los medios enumerados a continuación. Los ejemplos de factores relevantes incluyen factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) (por ejemplo, FGF1-10), factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de queratinocitos, factores de crecimiento de células endoteliales vasculares (VEGF) (por ejemplo, VEGF A, B, C, D y E), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), interferones (IFN) (por ejemplo, IFN- α , β o γ), factores de crecimiento transformantes (TGF) (por ejemplo, TGF α o β), factor α de necrosis tumoral, una interleucina (IL) (por ejemplo, IL-1 - IL-18), Osterix, Hedgehogs (por ejemplo, sonic o desert), SOX9, proteínas morfogénicas óseas, hormona paratiroidea, calcitonina prostaglandinas, o ácido ascórbico.

Los factores que son proteínas también pueden administrarse a un sujeto receptor administrando al sujeto: (a) vectores de expresión (por ejemplo, plásmidos o vectores virales) que contienen secuencias de ácido nucleico que codifican uno cualquiera o más de los factores anteriores que son proteínas; o (b) células que han sido transfectadas o transducidas (de forma estable o transitoria) con dichos vectores de expresión. En los vectores de expresión, las

secuencias de codificación están unidas operativamente a uno o más elementos reguladores de la transcripción (TRE). Las células utilizadas para la transfección o transducción pueden derivarse del receptor o ser histocompatibles con él. Sin embargo, es posible que solo se requiera una breve exposición al factor y, por lo tanto, también se pueden usar células no histocompatibles. Las celdas pueden incorporarse en la ATM (particulada o no
 5 particulada) antes de que las matrices se coloquen en el sujeto. Como alternativa, se pueden inyectar en una ATM que ya está en su lugar en un sujeto, en una región cercana a una ATM que ya está en su lugar en un sujeto, o sistémicamente.

Naturalmente, la administración de la ATM y/o cualquiera de las otras sustancias o factores mencionados
 10 anteriormente, puede ser simple o múltiple. Cuando es múltiple, las administraciones pueden ser a intervalos de tiempo fácilmente determinables por un experto en la técnica. Las dosis de las diversas sustancias y factores variarán enormemente de acuerdo con la especie, edad, peso, tamaño y sexo del sujeto, y también pueden determinarse fácilmente por un experto en la técnica.

Las condiciones para las que pueden usarse las matrices son múltiples. Por lo tanto, por ejemplo, pueden usarse
 15 para la reparación de huesos y/o cartílago con cualquiera de los daños o defectos descritos anteriormente. Tanto la ATM particulada como la no particulada se pueden usar en cualquiera de las formas y mediante cualquiera de los procedimientos enumerados anteriormente. Los huesos a los que se pueden aplicar tales procedimientos de
 20 tratamiento incluyen, sin limitación, huesos largos (por ejemplo, tibia, fémur, húmero, radio, cúbito o peroné), huesos de la mano y el pie (por ejemplo, calcáneo o escafoides), huesos de la cabeza y el cuello (por ejemplo, hueso temporal, hueso parietal, hueso frontal, maxilar superior, mandíbula), o vértebras. Como se ha mencionado anteriormente, los defectos de hueso críticos del hueso se pueden tratar con ATM. En dichos defectos de hueso críticos, los huecos se pueden llenar con, por ejemplo, una masilla o láminas empaquetadas de ATM y envolverse con láminas de ATM. Como alternativa, los huecos pueden envolverse con una lámina de ATM y llenarse con otros
 25 materiales (véase a continuación). En todos estos tratamientos de huesos y/o cartílagos, se pueden usar materiales adicionales para ayudar aún más en el procedimiento de reparación. Por ejemplo, el hueco puede llenarse con hueso esponjoso y/o gránulos de sulfato de calcio y puede administrarse ATM particulada a sitios de daño óseo o defectos óseos mezclada con polvo de hueso desmineralizado. Además, la ATM se puede combinar con médula ósea y/o astillas de hueso del receptor.

La ATM también se puede usar para reparar la fascia, por ejemplo, la fascia de la pared abdominal o la fascia del
 30 suelo pélvico. En dichos procedimientos, las tiras de ATM generalmente están unidas al suelo abdominal o pélvico, por ejemplo, por sutura a la fascia circundante o al tejido huésped o a ligamentos o tendones estables tal como el ligamento de Cooper.

Las ATM son muy adecuadas para la reparación de hernias. Una hernia es la protrusión del contenido de una
 35 cavidad corporal fuera de la cavidad corporal en la que normalmente se encuentra el contenido. Este contenido a menudo está encerrado en la fina membrana que recubre el interior de la cavidad corporal; juntos, la membrana y el contenido, se denominan "saco herniario". Más comúnmente, las hernias se desarrollan en el abdomen, cuando una debilidad en la pared abdominal se expande en un orificio o defecto localizado a través del cual se produce la protrusión intestinal. Estas debilidades en la pared abdominal generalmente ocurren en lugares de adelgazamiento natural de la pared abdominal, es decir, en sitios donde hay aberturas naturales que permiten el paso de canales para los vasos sanguíneos que se extienden desde el abdomen hasta las extremidades y otros órganos. Otras áreas de debilidad potencial son los sitios de cualquier cirugía abdominal previa. El tejido graso por lo general entra en una
 40 hernia primero, pero puede ir seguido de un segmento de intestino u otro órgano intraabdominal. Si un segmento del órgano interno queda atrapado dentro del saco herniario de manera que el suministro de sangre al órgano se altere, el paciente corre el riesgo de sufrir complicaciones graves, incluyendo bloqueo intestinal, gangrena y muerte. Las hernias no se curan espontáneamente y con frecuencia aumentan de tamaño con el tiempo, de manera que la reparación quirúrgica es necesaria para corregir la afección. En general, las hernias se reparan reinsertando el saco herniario de nuevo en la cavidad corporal seguido de la reparación del tejido muscular debilitado.
 45
 50

Hay muchos tipos de hernias. Con la excepción de las hernias inguinales y escrotales, que solo están presentes en los hombres, las hernias se pueden encontrar en individuos de cualquier edad o sexo. Los ejemplos de hernias incluyen: hernias inguinales directas, en las cuales el intestino puede abombarse hacia el canal inguinal a través de
 55 la pared posterior del conducto inguinal; hernias inguinales indirectas, en las cuales el intestino puede abombarse hacia el canal inguinal a través de una debilidad en el ápice del canal inguinal; hernias femorales, en las que el contenido abdominal pasa al área débil creada por el paso de los vasos sanguíneos femorales a las extremidades inferiores; hernias escrotales, en las que el contenido intestinal se abomba hacia el escroto; hernia de Spigelian, en la que la hernia se produce a lo largo del borde del músculo recto abdominal; hernia obturatriz, en la que el contenido abdominal (por ejemplo, intestino u otros órganos abdominales) sobresalen en el canal obturador, hernias lumbares, por ejemplo, hernia de Petit, en la que la hernia pasa por el triángulo de Petit, el triángulo lumbar inferior, y hernia de Grynfeltt, en la que la hernia pasa a través del triángulo de Grynfeltt-Lesshaft, el triángulo lumbar superior; hernia de Richter, en la que solo se estrangula una pared lateral del intestino; hernia de Hesselbach, en la que la hernia pasa por el triángulo de Hesselbach; hernia pancreática, en la que el saco herniario sobresale a cada lado de los vasos epigástricos inferiores para producir una hernia inguinal directa e indirecta combinada; hernia de Cooper; hernia epigástrica (en la que la hernia se produce entre el ombligo y la parte inferior de la caja torácica en la línea
 60
 65

media del abdomen); hernias diafragmáticas o hiales, por ejemplo, hernia de Bochdalek y hernia de Morgagni, en la que una porción del estómago sobresale a través del hiato esofágico diafragmático; y hernia umbilical, en la que la protrusión es a través del ombligo.

5 En contraste con las hernias de origen congénito, las hernias incisionales, también conocidas como hernias ventrales o recurrentes, se producen en el abdomen en el área de una cicatriz quirúrgica antigua. Las hernias incisionales tienen un riesgo de regresar después de la reparación quirúrgica mayor que las hernias congénitas. Además, en el caso de múltiples hernias recidivantes, es decir, hernias que reaparecen después de dos o más reparaciones, la probabilidad de una reparación exitosa disminuye con cada procedimiento posterior.

10 El miocardio infartado es otro candidato para la reparación de remodelación por ATM. Contrariamente al dogma anterior, ahora se sabe que no todos los miocitos cardíacos han perdido potencial proliferativo y, por lo tanto, regenerativo [por ejemplo, Beltrami et al. (2001) *New. Engl. J. Med.* 344:1750-1757; Kajstura et al. (1998) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 95:8801-8805]. Además, las células madre, presentes por ejemplo en la médula ósea y la sangre y como pericitos asociados con los vasos sanguíneos, pueden diferenciarse a miocitos cardíacos. O bien el propio tejido infartado se puede eliminar y reemplazar con una lámina de ATM cortada a un tamaño apropiado o se puede inyectar una suspensión de ATM particulada en el tejido infartado. La hipoplasia cardíaca congénita, u otros defectos estructurales, pueden repararse, por ejemplo, realizando una incisión en el tejido, expandiendo el hueco creado por la incisión, e insertando una lámina de ATM cortada al tamaño deseado, o colocando láminas de ATM en las superficies epicárdica y endocárdica y la colocación de ATM particulada entre ellas. Se entiende que, en ciertas condiciones, crear un hueco por incisión puede no ser suficiente y puede ser necesario extirpar parte del tejido. Naturalmente, un experto en la técnica apreciará que la ATM puede utilizarse de manera similar para reparar daños o defectos en otros tipos de músculos, por ejemplo, uréter o vejiga o músculo esquelético tal como bíceps, pectoral o dorsal ancho.

25 Además, las láminas de ATM pueden usarse para reparar o reemplazar tejido intestinal dañado o eliminado, incluyendo el esófago, el estómago y el intestino delgado y grueso. En este caso, las láminas de ATM se pueden utilizar para reparar perforaciones u orificios en el intestino. Como alternativa, se puede formar una lámina de ATM, por ejemplo, en un cilindro que se puede usar para llenar un hueco en el intestino (por ejemplo, un hueco creado por cirugía para extirpar un tumor o un segmento enfermo del intestino). Dichos procedimientos se pueden usar para tratar, por ejemplo, hernias diafragmáticas. Se entenderá que también se puede usar una ATM en forma de lámina para reparar el propio diafragma en esta condición, así como en otras condiciones del diafragma que requieren reparación o reemplazo, o la adición de tejido.

35 Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar, no limitar, la presente descripción.

Ejemplos

40 A menos que se indique lo contrario a continuación, las ATM utilizadas en los siguientes ejemplos se procesaron de acuerdo con la metodología patentada de LifeCell. La metodología para fabricar ATM se describe ampliamente en este ejemplo y los detalles para la ATM utilizada en experimentos individuales se proporcionan en los ejemplos relevantes. La siguiente descripción es la utilizada para la producción de ATM de piel humana.

45 Se obtuvo piel de donante humano de varios bancos de tejidos de EE.UU. y hospitales de todo el país que recogieron muestras de piel de donantes fallecidos después de obtener el consentimiento de los miembros de la familia. La piel obtenida se puso en medio de cultivo tisular RPMI 1640 que contenía antibióticos (penicilina y estreptomycin) y se envió a las instalaciones de LifeCell en Branchburg, Nueva Jersey, sobre hielo húmedo, en el mismo medio. Al llegar, se mide la temperatura del recipiente del tejido cutáneo y se descarta el tejido cutáneo si la temperatura es superior a 10°C. El medio RPMI 1640 se cambió en condiciones asépticas y la piel se almacenó a 4°C, mientras que se realizaron pruebas serológicas (por ejemplo, RPR, VDRL, VIH I y II, antígeno de superficie de hepatitis B, virus de hepatitis C y HTLV I y II). La piel se transfirió después a una solución acuosa de pre congelación de maltodextrina al 35% p/v. Después de 2 a 4 horas, la piel se congeló y almacenó en un congelador a -80°C, hasta que se procesó como se describe a continuación.

55 La piel congelada se descongeló a 37°C en un baño de agua hasta que no quedó hielo visible. La solución de pre congelación se drenó antes del procesamiento posterior, que consistía en las siguientes etapas: (i) desepidermización; (ii) descelerización; (iii) lavado; (iv) incubación en solución de lioprotector; (v) liofilización.

60 (i) Desepidermización: Se eliminó la epidermis cutánea incubando la muestra de tejido con agitación suave en una solución de desepidermización (NaCl 1 M, Tritón X100 al 0,5% p/v, EDTA 10 mM) durante 8 - 32 horas para la piel humana a temperatura ambiente. La capa epidérmica se eliminó de la dermis. La epidermis se descartó y la dermis se conservó para su posterior procesamiento.

65 (ii) Descelerización: Para eliminar los componentes celulares, la dermis se aclaró durante 5 a 60 minutos con una solución de descelerización (desoxicolato sódico al 2% p/v, EDTA 10 mM, tampón HEPES 10 mM, pH 7,8 - 8,2), y luego se incubó con agitación suave en esa solución durante 12-30 horas a temperatura ambiente.

(iii) Lavado: El régimen de lavado sirve para eliminar por lavado las células muertas, los restos celulares y los

productos químicos residuales que se utilizan en las etapas de procesamiento anteriores. La dermis descelularizada se transfirió a una primera solución de lavado (solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía Tritón X-100 al 0,5% p/v y EDTA 10 mM) que luego se incubó con agitación suave durante 5 a 60 minutos a temperatura ambiente. La dermis se sometió entonces a tres lavados secuenciales en una segunda solución de lavado (PBS que contenía EDTA 10 mM) con agitación suave a temperatura ambiente. Los primeros

(iv) Incubación en solución crioprotectora. Después del régimen de lavado, la matriz de tejido se transfirió a una solución crioprotectora que contenía maltodextrina al 15% p/v durante 5-24 horas a temperatura ambiente. Durante la incubación, la ATM y la solución se agitaron.

(v) Liofilización. Después de la incubación con crioprotector, la ATM resultante se cortó en tamaños adecuados, se liofilizó, y luego se usó para los diversos ensayos.

El tratamiento con elastasa, cuando se implementó, se realizó después de la etapa de lavado (iii). La elastasa utilizada era natural y se extrajo de páncreas porcinos. La elastasa se obtuvo de la empresa Sigma Aldrich. La elastasa liofilizada se reconstituyó con tampón Tris-HCl 200 mM (pH 8,8) (por ejemplo, solución madre). El material de ATM de la etapa (ii) se aclaró primero con Tris-HCl 100 mM (pH 8,0), y se drenó el tampón. Después del aclarado, se añadió Tris-HCl 100 mM (pH 8,0) en un volumen de aproximadamente 3 ml por gramo de tejido en botellas de plástico. Se añadió una solución madre de elastasa a una concentración enzimática final de entre aproximadamente 0,1-0,5 unidades por ml, y la mezcla de material tisular y la solución de elastasa se trató a temperatura ambiente (por ejemplo, aproximadamente de 20 a 25°C) durante una noche (de aproximadamente 18 a 22 horas).

Efecto del tratamiento con elastasa sobre la capacidad de estiramiento tisular

Se estudió el efecto del tratamiento con elastasa sobre la capacidad de estiramiento de una muestra de tejido. Basándose en ese estudio, se concluyó que la capacidad de estiramiento de una muestra de tejido probablemente disminuye como resultado de la exposición al tratamiento con elastasa. Además, las variaciones en la capacidad de estiramiento del tejido se pueden reducir exponiendo un grupo de muestras de tejido al tratamiento con elastasa.

Ejemplo 1

La capacidad de estiramiento de las mATM tratadas con elastasa se comparó con la capacidad de estiramiento de las ATM sin tratar. En este ejemplo, se obtuvieron treinta (30) pares de muestras de tejido. Cada par de muestras de tejido incluía una muestra de tejido no tratada y una muestra de tejido tratada con elastasa del mismo lote donante. Todas las muestras de tejido se procesaron de acuerdo con la metodología patentada de LifeCell analizada anteriormente, exponiendo una porción de los tejidos al tratamiento con elastasa después del lavado del tejido (etapa (iii)). El tratamiento con elastasa incluía colocar las muestras de tejido en una solución de 0,25 unidades/mL de elastasa e incubar la mezcla de muestras de tejido y la solución de elastasa durante aproximadamente 20-24 horas a temperatura ambiente. Después del tratamiento con elastasa, las muestras de tejido se lavaron en una solución de lavado tisular.

Las muestras de tejido tratadas con elastasa se compararon con un grupo control de muestras de tejido que no se habían expuesto al tratamiento con elastasa. En este ejemplo, la capacidad de estiramiento se indica mediante el porcentaje de extensión ("%") que experimenta una muestra de tejido de aproximadamente un centímetro de longitud cuando se somete a una fuerza de tracción de aproximadamente 5 Newtons ("5 N"). La FIG. 3 es un gráfico que proporciona dichos datos para numerosas ATM tratadas con elastasa (círculos de color oscuro) y ATM no tratadas con elastasa. El gráfico muestra la edad de los donantes (en años) en la abscisa (eje x) y muestra el porcentaje de extensión bajo la fuerza aplicada sobre la ordenada (eje y). Para los puntos de datos de mATM tratadas con elastasa (círculos de color oscuro), hay un punto de datos de ATM no tratadas (círculo transparente) correspondiente del mismo lote de donantes.

Los datos en el gráfico muestran que las mATM tratadas con elastasa experimentaron un menor porcentaje de extensión que sus respectivas ATM no tratadas correspondientes. Como ejemplo, el par de puntos de datos correspondientes a la edad del donante justo por encima de veinte, muestran que la ATM no tratada se extendió más del 60% bajo la fuerza de tracción aplicada, mientras que la mATM tratada con elastasa correspondiente se extendió menos del 20%. Esto representa una reducción significativa en la capacidad de estiramiento.

Además, los datos en el gráfico muestran que el grado de variación en la capacidad de estiramiento en la población de ATM no tratadas (círculos transparentes) es relativamente grande. De hecho, algunas de las ATM no tratadas se extendieron menos del 20%, mientras que otras se extendieron más del 60%. En general, las ATM no tratadas de donantes de mayor edad tienden a ser menos elásticas que las ATM no tratadas de donantes más jóvenes.

En marcado contraste, el grado de variación en la capacidad de estiramiento en la población de mATM tratadas con elastasa (círculos de color oscuro) es relativamente pequeño. De hecho, bajo la fuerza de tracción aplicada, muchas de las mATM tratadas con elastasa se extendieron aproximadamente el 19% y todas las mATM tratadas con elastasa se extendieron entre aproximadamente el 14% y aproximadamente el 24%. Esta variación en la capacidad

de estiramiento (de aproximadamente el 14% a aproximadamente el 24%) de las mATM tratadas con elastasa se indica mediante una banda sombreada en el gráfico ilustrado.

La concentración de elastasa tan baja como 0,1 unidades/ml fue suficiente

Se examinó la eficacia de diversas concentraciones de elastasa. Se determinó que una concentración de elastasa tan baja como 0,1 unidades/mililitro era suficiente para afectar a la capacidad de estiramiento de la muestra de tejido dérmico.

Ejemplo 2

Las muestras de tejido se procesaron usando la metodología patentada de LifeCell, que se ha descrito anteriormente. Después del lavado del tejido (etapa iii), las muestras de tejido se expusieron al tratamiento con elastasa. Durante el tratamiento con elastasa, las muestras de tejido se expusieron a soluciones de elastasa que tenían concentraciones de elastasa de aproximadamente 0,1 unidades/mililitro o aproximadamente 0,5 unidades/mililitro, respectivamente. Las soluciones de elastasa se combinaron con las muestras de tejido a aproximadamente 3 mililitros de solución por gramo de muestra de tejido húmedo. La exposición a elastasa duró aproximadamente 18 horas. Después de la exposición a elastasa, las muestras de tejido se aclararon con tampón Tris-HCl, se incubaron en una solución de liofilización, y se liofilizaron.

Las FIGS. 4A y 4B muestran, respectivamente, una muestra de tejido no tratado (FIG. 4A) y una muestra de tejido que se trató con una solución de elastasa a una concentración de 0,1 unidades/mililitro (FIG. 4B). Ambas muestras están teñidas con tinción de Verhoeff. La muestra de tejido tratada con elastasa era del mismo lote de donante que la muestra de tejido no tratada. El sombreado de la tinción muestra el respectivo contenido de elastina de las muestras de tejido. Una comparación visual de la FIG. 4A y 4B revela que la red de elastina en la FIG. 4B parece haber sido al menos parcialmente alterada. En consecuencia, parece que una solución con una concentración de elastasa al menos tan baja como 0,1 unidades/mililitro es suficiente para afectar a la capacidad de estiramiento de la muestra de tejido.

Se cree que el tratamiento con elastasa rompe los enlaces peptídicos en la ACM para producir una mATM con una red de elastina alterada. Típicamente, se rompe un número suficiente de enlaces peptídicos para producir cierto grado de capacidad de estiramiento reducida en la mATM con respecto a la ATM. Típicamente, el número de enlaces peptídicos que se rompen es suficiente en la medida en que el porcentaje de extensión (o deformación) de la mATM bajo una cantidad específica de fuerza de tracción es inferior al 95% (por ejemplo, menor del: 95%; 90%; 85%; 80%; 75%; 70%; 65%; 60%; 55%; 50%; 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, o del 2%) del porcentaje de extensión (o deformación) de la ATM correspondiente bajo la misma cantidad de fuerza de tracción.

Los tejidos tienden a aumentar de tamaño a partir del tratamiento con elastasa

Se estudió el efecto que tiene el tratamiento con elastasa sobre el tamaño de una muestra de tejido. Basándose en ese estudio, se determinó que el tamaño de las muestras de tejido probablemente aumenta como resultado de la exposición al tratamiento con elastasa.

Ejemplo 3

Se determinaron las dimensiones de treinta y tres (33) pares de muestras de tejido. Cada par de muestras de tejido incluía una muestra de tejido no tratada y una muestra de tejido tratada con elastasa del mismo lote donante. En resumen, se midieron las dimensiones físicas de ATM no tratadas de treinta y tres (33) lotes donantes, y se determinó el área (es decir, longitud por ancho) de cada muestra. Las ATM no tratadas se sometieron a tratamiento con elastasa, dando como resultado mATM tratadas con elastasa. Se midieron las mismas dimensiones físicas de las mATM tratadas con elastasa, y se determinó el área (es decir, longitud por ancho) de cada mATM tratada con elastasa. Las áreas calculadas respectivas para cada par de ATM y mATM se compararon para determinar cuánto aumentó de tamaño cada tejido como resultado de su exposición al tratamiento con elastasa.

El gráfico de la FIG. 5 proporciona los resultados de este experimento e indica el porcentaje de aumento en el área que experimentó cada una de las treinta y tres muestras de tejido como resultado del tratamiento con elastasa. El gráfico muestra los números de lote de donantes arbitrarios en su abscisa (eje x) y el porcentaje de aumento del tejido en el área ("% del área") en su ordenada (eje y).

Los datos indican que algunas de las muestras de tejido experimentaron un aumento de tamaño pequeño o nulo. Por ejemplo, los datos que corresponden a los números de lote de donante 1-4 muestran que esas muestras de tejido prácticamente no experimentaron un aumento de tamaño. Sin embargo, otras muestras de tejido experimentaron un aumento significativo en el tamaño. Por ejemplo, los datos que corresponden al lote donante n.º 33 muestran que esa muestra de tejido experimentó un aumento de tamaño de más del 100%.

En promedio, las muestras de tejido representadas en el gráfico de la FIG. 5 experimentaron un aumento de tamaño

de aproximadamente el 34,8% con una desviación estándar de aproximadamente +/-29,2%.

Ejemplo 4

5 La FIG. 6 es una vista en planta de una ATM no tratada 402 junto a una mATM tratada con elastasa 404.

10 Antes del tratamiento con elastasa, las muestras de tejido 402 y 404 eran de los mismos lotes de donante. Eran de la misma ubicación del mismo animal y tenían dimensiones físicas similares (es decir, a lo largo y a lo ancho) entre sí. La observación visual y la referencia a la regla revelan que la mATM tratada con elastasa es claramente más grande que la ATM no tratada. De hecho, aunque la ATM no tratada 402 tiene una longitud de aproximadamente 3/8 de pulgada, la mATM tratada con elastasa 404 tiene una longitud de aproximadamente 5/8 de pulgada. Además, la mATM tratada con elastasa 404 es claramente más ancha que la ATM no tratada 402.

Ejemplo 5

15 La Tabla 1 muestra las dimensiones físicas de treinta (30) pares de muestras de tejido de diferentes lotes de donantes antes del tratamiento con elastasa y después del tratamiento con elastasa.

Tabla 1

Lote n.º	Antes del tratamiento con elastasa		Después del tratamiento con elastasa	
	D inferior (cm)	D superior (cm)	D inferior (cm)	D superior (cm)
B20619	3,3	5,5	4,0	6,0
B20621	3,0	6,5	3,5	8,5
B20623	3,5	4,0	3,5	4,5
B20624	3,5	6,0	4,0	6,5
B20617	3,0	4,5	3,0	4,5
C20646	3,0	5,0	3,5	6,0
C20643	4,5	6,0	6,0	8,0
C20649	6,0	8,0	6,0	9,0
C20651	3,0	10,0	4,0	12,0
C20655	5,0	6,0	6,0	7,5
B20664	2,0	8,0	3,0	10,0
B20669	2,5	5,0	2,5	6,5
B20672	3,5	6,0	4,0	8,0
B20673	2,5	6,0	2,5	7,0
B20673	3,5	4,5	3,5	5,0
B20747	3,5	3,5	4,5	4,5
B20749	4,2	6,0	6,0	9,0
B20752	4,0	6,0	5,0	7,5
B20753	3,0	8,0	3,5	11,0
B20759	3,0	7,5	3,5	7,0
B20837	5,0	6,0	5,0	7,0
B20842	5,5	8,5	6,8	10,8
B20844	5,0	8,0	6,0	8,3
B20849	7,5	10,0	7,0	11,0
B20855	5,0	6,0	5,0	6,5
B20908	3,0	4,0	3,0	4,5
B20900	4,0	6,0	4,0	6,0
B20911	4,0	5,0	4,0	5,0
B20914	3,0	5,7	3,5	6,3
B20915	2,3	3,3	3,0	3,3

20 Las dimensiones físicas incluyen, para muestras de tejido antes y después del tratamiento con elastasa, una dimensión más pequeña en centímetros ("cm"), identificada como "D inferior (cm)" y una dimensión más grande en centímetros ("cm"), identificada como "D superior (cm)".

25 Los datos muestran que el tratamiento con elastasa provocó aumentos en la dimensión más pequeña o más grande que oscilaban entre el 0% y el 50%. Para la mayoría de las muestras de tejido, los datos muestran que al menos una de las dimensiones medidas aumentó de tamaño desde el tratamiento con elastasa. El aumento medio de tamaño en la dimensión más pequeña fue del 14,7% con una desviación estándar del 14,5%. El aumento medio de tamaño en la dimensión más grande fue del 17,3% con una desviación estándar del 13,0%.

30 Efecto del tratamiento con elastasa sobre el contenido de elastina

Se consideró el efecto del tratamiento con elastasa sobre el contenido de elastina en un tejido. El análisis del contenido de elastina se realizó usando un ensayo de elastina FASTIN™, disponible en Bicolor Ltd, Reino Unido, que implica la unión a colorante específica utilizando una porfirina sintética (5, 10, 15, 20 tetrafenil-21, 25 porfirina en forma de sulfonato).

5

Ejemplo 6

La Tabla 2 muestra el contenido de elastina en muestras de tejido de treinta (30) lotes de donantes emparejados diferentes antes del tratamiento con elastasa y después del tratamiento con elastasa. El contenido de elastina se midió usando el ensayo de elastina FASTIN™. Antes del tratamiento con elastasa, el contenido de elastina varió de aproximadamente el 1,6% a aproximadamente el 5,1% en peso. Después del tratamiento con elastasa, el contenido de elastina varió de aproximadamente el 1,4% a aproximadamente el 6,1%.

10

Tabla 2

N.º de lote	Antes del tratamiento con elastasa	Después del tratamiento con elastasa
B20619	2,3%	2,2%
B20621	2,3%	2,4%
B20623	2,8%	2,3%
B20624	2,8%	2,1%
B20617	1,9%	2,1%
C20646	-	1,8%
C20643	2,6%	2,4%
C20649	3,1%	2,5%
C20651	1,9%	1,8%
C20655	1,6%	2,0%
B20664	2,5%	3,2%
B20669	2,9%	2,0%
B20672	1,9%	1,4%
B20673	2,3%	1,8%
B20679	2,3%	1,7%
B20747	3,7%	1,8%
B20749	-	2,6%
B20752	2,2%	1,9%
B20753	2,7%	1,9%
B20759	2,6%	2,0%
B20837	2,4%	2,4%
B20842	2,2%	2,2%
B20844	2,7%	1,9%
B20849	3,8%	3,1%
B20855	2,3%	1,4%
B20908	2,9%	3,8%
B20900	3,7%	6,1%
B20911	5,1%	3,9%
B20914	4,0%	2,1%
B20915	3,2%	2,5%

15

Los datos que se muestran en la Tabla 2 indican que el tratamiento con elastasa provocó que el contenido de elastina aumentara en algunos de los lotes de donantes y disminuyera en otros. Sin embargo, los aumentos aparentes están dentro del error/incertidumbre de las mediciones. Cuando se mira el promedio de todos los materiales, el contenido de elastina disminuye un poco.

20

Según los datos, antes del tratamiento con elastasa, el valor medio del contenido de elastina en el grupo de muestras de tejido fue del 2,74%, con una desviación estándar de +/-0,76%. Después del tratamiento con elastasa, el valor medio del contenido de elastina en el grupo de muestras de tejido fue del 2,38%, con una desviación estándar de +/-0,92%.

25

El tratamiento con elastasa, por lo tanto, produjo una pérdida estadísticamente significativa, pero pequeña, de contenido de elastina. Se cree que después del tratamiento con elastasa, la elastina en forma de elastina fragmentada estaba presente en las muestras de tejido.

30 Efecto sobre las propiedades de tracción de la muestra de tejido

Se consideró el efecto del tratamiento con elastasa sobre diversas propiedades de tracción de una muestra de tejido.

Ejemplo 7

En este ejemplo, se realizaron pruebas en muestras de tejido de treinta (30) lotes de donantes emparejados. Cada par de muestras de tejido incluía una muestra de tejido no tratada y una muestra de tejido tratada con elastasa del mismo lote donante. En otras palabras, para cada lote de donante, hay muestras de tejido tratadas con elastasa y muestras no tratadas. Cada muestra de tejido se sometió a pruebas para determinar su carga máxima, tensión de tracción, porcentaje de deformación y módulo de Young. Los resultados de estos ensayos se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3

Tratamiento	Carga máxima (N/cm)	Tensión de tracción a carga máxima (MPa)	Deformación a 5 N/cm (%)	Módulo de Young (MPa)
ALLODERM® regular	170 ± 109	7,5 ± 3,9	39 ± 14	24,7 ± 11,7
RTM tratada con elastasa	176 ± 110	7,9 ± 4,4	19 ± 5	31,3 ± 17,3
Valor de P	0,330	0,220	0,000	0,004

Con referencia a la Tabla 3, la carga máxima refleja la fuerza máxima por centímetro en newtons por centímetro ("N/cm") que las muestras de tejido pudieron soportar antes de romperse. Como se muestra en la tabla, la carga máxima media que las muestras de tejido no tratadas con elastasa (identificadas como "ALLODERM® regular" en la tabla) podían soportar fue de 170 newtons/centímetro, con una desviación estándar de 109 newtons/centímetro. La carga máxima media que las muestras de tejido tratadas con elastasa (identificadas como "RTM tratada con elastasa" en la tabla) podían soportar fue de 176 newtons/centímetro, con una desviación estándar de 110 newtons/centímetro. El valor de p para los datos de carga máxima recopilados, que generalmente representa la probabilidad de que los resultados observados (o los resultados más extremos) puedan haber ocurrido por casualidad, fue de 0,330. La probabilidad de que el tratamiento con elastasa pueda afectar negativamente la capacidad de carga máxima de una muestra de tejido parece pequeña.

La tensión de tracción proporciona una medida de la distribución interna de la fuerza por unidad de área que se equilibra y reacciona a una carga externa aplicada. La tensión de tracción a la carga máxima (o conocida como resistencia a la tracción) es la tensión de tracción máxima que el tejido puede soportar antes de romperse. La tensión de tracción media a la carga máxima en megapascuales (MPa) de las muestras de tejido no tratadas con elastasa fue de 7,5, con una desviación estándar de 3,9. La tensión de tracción media a la carga máxima de las muestras de tejido tratadas con elastasa fue de 7,9, con una desviación estándar de 4,4. El valor de p para los datos de tensión de tracción recogidos fue de 0,220. La probabilidad de que el tratamiento con elastasa pueda alterar significativamente la resistencia a la tracción de una muestra de tejido parece pequeña.

Los valores de deformación proporcionan una medida de la deformación que se produce en una muestra de tejido como resultado de una carga aplicada externamente. El porcentaje medio de deformación (porcentaje de extensión) de muestras de tejido no tratadas con elastasa bajo una fuerza de 5 newtons/centímetro fue del 39%, con una desviación estándar del 14%. El porcentaje medio de deformación (porcentaje de extensión) de las muestras de tejido tratadas con elastasa bajo la misma carga fue del 19%, con una desviación estándar del 5%. El valor de p para los datos de la cepa recogida fue de 0,000. En vista de lo anterior, el tratamiento reduce la capacidad de estiramiento tisular, y aumenta la consistencia en la elasticidad y rigidez del tejido.

El módulo de Young refleja la resistencia de las muestras de tejido al alargamiento cuando se aplica una fuerza externa. El módulo de Young medio, en megapascuales ("MPa"), para las muestras de tejido no tratadas con elastasa fue de 24,7 megapascuales, con una desviación estándar de 11,7 megapascuales. El módulo de Young medio para las muestras de tejido tratadas con elastasa fue de 31,3 megapascuales, con una desviación estándar de 17,3 megapascuales. El valor de p para los datos del módulo de Young recogidos fue 0,004. En vista de lo anterior, el tratamiento aumenta la rigidez.

Los datos de carga máxima, la resistencia a la tracción y el módulo de Young en la Tabla 3 indican que el efecto del tratamiento con elastasa sobre esas propiedades es despreciable.

Ejemplo 8

Se procesaron muestras de tejido de dos lotes de donantes de acuerdo con la metodología patentada de LifeCell analizada anteriormente. Después del lavado del tejido (etapa (iii)), las muestras de tejido se cortaron en múltiples trozos de 1 centímetro x 7 centímetros. Algunos de esos trozos se expusieron al tratamiento con elastasa.

Las muestras de tejido no tratadas y tratadas con elastasa de los dos lotes de donantes se sometieron a ensayo para determinar su espesor, carga máxima, tensión de tracción, elasticidad, porcentaje de deformación y módulo de Young. Cada uno de estos parámetros se analizó con cierto detalle anteriormente, excepto el espesor y la elasticidad. El espesor es una dimensión física del tejido y, en la tabla ilustrada, se mide en milímetros ("mm"). La

elasticidad se refiere generalmente a la tendencia de un cuerpo a volver a su forma original después de haber sido estirado o comprimido y, en la tabla ilustrada, se mide en newtons/centímetro ("N/cm").

Los resultados de los ensayos anteriores se resumen en la Tabla 4. Los datos en esa tabla indican que, con la posible excepción de la deformación a 5 newtons/centímetro, el tratamiento con elastasa no alteró significativamente ninguna de las propiedades probadas. Para las muestras de tejido en el lote de donante n.º 40765, por ejemplo, el tratamiento con elastasa dio como resultado un cambio en la tensión media (a 5 newtons/centímetro) del 0,35% al 0,2% (disminuyó significativamente). Para muestras de tejido en el lote de donante n.º 24750, el tratamiento con elastasa dio como resultado un cambio en la deformación media del 0,19% al 0,22% (sin diferencia significativa).

Tabla 4

Tratamiento	Espesor (mm)	Carga máxima (N/cm)	Tensión de tracción a carga máxima (MPa)	Elasticidad a 5 N/cm (N/cm)	Deformación a 5 N/cm (%)	Módulo de Young (MPa)
Lote n.º 40765 (N = 11)						
Control	3,87 ± 0,87	197 ± 47	5,4 ± 1,8	439 ± 121	0,35 ± 0,10	12,0 ± 4,3
Elastasa	3,93 ± 0,92	173 ± 37	4,6 ± 1,5	503 ± 86	0,20 ± 0,03	13,4 ± 3,4
Lote n.º 24750 (N = 12)						
Control	1,66 ± 0,21	146,4 ± 45	8,8 ± 2,2	541 ± 195	0,19 ± 0,03	33,1 ± 12,0
Elastasa	1,86 ± 0,22	145,5 ± 30	7,9 ± 1,6	498 ± 145	0,22 ± 0,03	27,2 ± 8,9

Efecto en la histología de la muestra de tejido

También se consideró el efecto del tratamiento con elastasa sobre la histología de una muestra de tejido.

Más particularmente, se consideraron diversos parámetros histológicos para doce (12) pares de muestras de tejido liofilizado. Cada par de muestras de tejido incluía una muestra de tejido no tratada y una muestra de tejido tratada con elastasa del mismo lote donante.

Ejemplo 10

La Tabla 5 muestra los resultados de la prueba de histología de muestras de tejido. Cada fila en la columna corresponde a una muestra de tejido que se ensayó. La primera columna de la tabla identifica el número de lote de donante de la muestra de tejido correspondiente, una designación arbitraria. La segunda columna de la tabla indica si la muestra de tejido correspondiente se había expuesto al tratamiento con elastasa. La designación "sin elastasa" significa que la muestra de tejido correspondiente no se trató, mientras que la designación "elastasa" indica que la muestra de tejido correspondiente se había expuesto al tratamiento con elastasa. Los datos en las primeras doce filas y los datos en las segundas doce filas corresponden a muestras de tejido de los mismos grupos de lotes de donantes.

Las columnas tercera, cuarta, quinta y sexta de la tabla indican los orificios totales, daño por colágeno, transición papilar a reticular y separación de colágeno en las muestras de tejido correspondientes.

Los orificios en las muestras de tejido pueden representar una diversidad de estructuras que incluyen vasos sanguíneos, adipocitos vacíos, folículos pilosos vacíos y expansión de burbujas de gas dentro de la muestra durante el procedimiento de liofilización. Histológicamente, es difícil distinguir entre estos y, por lo tanto, la presencia de orificios se gradúa de acuerdo con el porcentaje de área total de la muestra ocupada por estas estructuras.

Puntuación:

Puntuación	Evaluación
1-2	Orificios en el 0%-10% de la muestra.
3-4	Orificios en el 11%-25% de la muestra.
5-6	Orificios en el 26%-40% de la muestra.
7-9	Orificios en el 41%-60% de la muestra.
10	Orificios en >60% de la muestra.

"Daño de colágeno" se refiere a la presencia de fibras de colágeno rotas, fibras de colágeno condensadas, o fibras distorsionadas. El daño del colágeno se informa como la incidencia de la observación en los campos visuales para todas las muestras. Puntuación:

Puntuación	Evaluación
1-2	Daño en el 0%-10% de los campos examinados
3-4	Daño en el 11%-25% de los campos examinados.
5-6	Daño en el 26%-50% de los campos examinados.
7-8	Daño en el 51%-75% de los campos examinados.

(continuación)

Puntuación	Evaluación
9-10	Daño en el 76%-100% de los campos examinados.

5 Con respecto a la transición papilar a reticular, la dermis humana normal contiene una capa papilar que consiste en una zona de membrana basal superficial y luego una capa de estructura vascular y amorfa que carece de haces gruesos de colágeno claramente definidos. El aspecto del colágeno y la elastina de la capa papilar es uno de reticulación fina. La capa reticular se fusiona con la capa papilar y se compone por haces de colágeno claramente definidos. Si se produce el colapso o la fusión durante el procesamiento del tejido para producir la ATM, habrá una condensación de la capa papilar. Si la piel tiene cicatrices extensas o está sujeta a un procedimiento patológico, tal como esclerodermia o epidermólisis, habrá una pérdida de la capa papilar. Si las muestras carecen de una capa papilar, el lote relevante fue rechazado. Puntuación:

Puntuación	Evaluación
0	Bicapa normal, plexo vascular claramente definido, transición clara.
0-2	Ondulaciones poco definidas de crestas interpapilares y crestas epidérmicas.
0-2	Pérdida de características estructurales en la capa papilar superficial, incluido el plexo vascular.
0-2	Pérdida de características estructurales en la capa papilar interna.
0-2	Pérdida de la zona de transición entre la capa papilar y reticular.
10	Ausencia o reemplazo de la capa papilar con capa amorfa condensada.

15 Separación de colágeno: El colágeno normal en una ATM debe tener una estructura fibrosa interna, y la separación entre los haces debe representar una transición gradual de una fibra a la siguiente. La separación de colágeno es un cambio reconocido que se produce en el procesamiento. En su extremo, la fibra de colágeno pierde su naturaleza fibrosa y aparece amorfa, la separación entre las fibras se convierte en una transición abrupta, y las fibras a menudo aparecen anguladas. Basándose en la evaluación animal y clínica, hasta la fecha no se puede atribuir ninguna importancia funcional a esta apariencia. Sin embargo, aunque no es motivo de rechazo en solitario, esto se incluye como parte de la evaluación de la integridad de la matriz.

Puntuación	Evaluación
1	Sin separación artificial, estructura fibrosa evidente.
3	Separación aguda, alguna definición fibrosa
5	Separación angular, aspecto de colágeno amorfo.

25 Los parámetros anteriores se determinaron basándose en la tinción con hematoxilina y eosina (H & E). Los datos en la tabla no muestran una diferencia significativa en los parámetros histológicos indicados para muestras de tejido tratadas con elastasa en comparación con muestras de tejido no tratadas con elastasa.

Tabla 5

N.º de lote	Tratamiento	Orificios totales	Daño de colágeno	Transición de papilar o reticular	Separación de colágeno de
B20747	Sin elastasa	9	9	8	4
B20749	Sin elastasa	8	9	7	4
B20752	Sin elastasa	7	8	7	4
B20753	Sin elastasa	8	10	7	4
B20759	Sin elastasa	8	9	8	4
B20837	Sin elastasa	8	10	8	4
B20842	Sin elastasa	6	9	8	4
B20844	Sin elastasa	5	10	10	4
B20849	Sin elastasa	9	10	10	5
B20855	Sin elastasa	5	8	7	3
40765	Sin elastasa	6	8	7	4
24750	Sin elastasa	7	8	8	4
B20747	Elastasa	6	8	10	4
B20749	Elastasa	7	9	8	4
B20752	Elastasa	5	7	8	3
B20753	Elastasa	6	8	7	4
B20759	Elastasa	7	9	8	4
B20837	Elastasa	7	10	10	5
B20842	Elastasa	6	8	8	4
B20844	Elastasa	5	9	8	4
B20849	Elastasa	8	10	8	5
B20855	Elastasa	5	9	8	4

(continuación)

N.º de lote	Tratamiento	Orificios totales	Daño de colágeno	Transición de papilar o reticular	Separación de colágeno
40765	Elastasa	8	8	8	3
24750	Elastasa	9	9	8	3

Ejemplo 11

5 La FIG. 7 muestra tinciones de Verhoeffs ejemplares para muestras de tejidos emparejados de dos de los lotes de donantes en el Ejemplo 10 (y se indican en la Tabla 5). Como se ha indicado anteriormente, cada par de muestras de tejido incluye una muestra de tejido no tratada (identificada como "ALLODERM® regular" en la FIG. 7) y una muestra de tejido tratada con elastasa (identificada como "Tratada con elastasa" en la FIG. 7). Las porciones oscuras de la tinción muestran la estructura de elastina de los tejidos. Para cada par de muestras de tejido, las tinciones de Verhoeff sugieren que el tratamiento con elastasa no causa una fragmentación o alteración sustancial de la estructura de elastina compleja de las muestras de tejido.

Ejemplo 12

15 La FIG. 8 muestra ejemplos de tinciones de azul Alcian para muestras de tejido emparejadas de dos de los lotes de donantes en el Ejemplo 10 (y se indican en la Tabla 5). Cada par de muestras de tejido incluye una muestra de tejido no tratada (identificada como "ALLODERM® regular" en la FIG. 8) y una muestra de tejido tratada con elastasa (identificada como "Tratada con elastasa" en la FIG. 8).

20 Para cada par de muestras de tejido, las tinciones con azul Alcian muestran una ligera reducción en la intensidad de la tinción en las muestras de tejido tratadas con elastasa en comparación con sus muestras de tejido no tratadas con elastasa correspondientes. Esta reducción en la intensidad de la tinción sugiere una pérdida parcial en glucosaminoglicano (GAG), presumiblemente debido a un tiempo prolongado en la solución acuosa de procesamiento.

25

Efecto del tratamiento con elastasa sobre la estabilidad térmica de la muestra de tejido**Ejemplo 13**

30 Se utilizó un análisis de calorimetría de barrido diferencial (DSC) para investigar los cambios en la estabilidad térmica de las muestras de tejido después del tratamiento con elastasa en doce (12) lotes donantes emparejados. La Tabla 6 muestra la temperatura de desnaturalización inicial medida en grados Celsius ("T_m inicial (°C)") y la entalpía de desnaturalización representada en Julios por gramo de peso seco ("J/gdw") para muestras de tejido de varios lotes de donantes. La desnaturalización se refiere a un cambio en la estructura tisular mediante la aplicación de calor, por ejemplo. La temperatura de desnaturalización inicial es la temperatura a la cual comienza la desnaturalización. La entalpía de desnaturalización es una medida de energía necesaria para desnaturalizar el colágeno tisular y otras proteínas.

40 Cada fila en la columna corresponde a una muestra de tejido particular que se ensayó. La primera columna de la tabla identifica el número de lote de donante de la muestra de tejido correspondiente. La segunda columna de la tabla indica si la muestra de tejido correspondiente se expuso al tratamiento con elastasa. La designación "sin elastasa" indica que la muestra de tejido correspondiente no se expuso al tratamiento con elastasa. La designación "elastasa" indica que la muestra de tejido correspondiente se expuso al tratamiento con elastasa. Las primeras doce filas de datos corresponden a muestras de tejido que no estuvieron expuestas al tratamiento con elastasa. Las últimas doce filas de datos corresponden a muestras de tejido que estuvieron expuestas al tratamiento con elastasa. Los datos en las primeras doce filas y los datos en las segundas doce filas corresponden a muestras de tejido de los mismos grupos de lotes de donantes.

50 Las columnas tercera y cuarta de la tabla muestran la temperatura de desnaturalización inicial y la entalpía de desnaturalización para cada muestra de tejido correspondiente.

Los datos en la tabla no muestran diferencias significativas en la temperatura de desnaturalización inicial o la entalpía de desnaturalización para muestras de tejido tratadas con elastasa en comparación con muestras de tejido no tratadas con elastasa. La temperatura media de desnaturalización inicial para muestras de tejido no tratadas con elastasa fue de 60,9°C con una desviación estándar de aproximadamente +/-1,3°C. La temperatura media de desnaturalización inicial para las muestras de tejido tratadas con elastasa fue de 60,8°C, con una desviación estándar de aproximadamente +/-1,2°C. La entalpía de desnaturalización media para las muestras de tejido no tratadas con elastasa fue de 25,8 J/gdw, con una desviación estándar de +/-2,7 J/gdw. La entalpía de desnaturalización media para las muestras de tejido tratadas con elastasa fue de 28,1, con una desviación estándar de +/-3,5.

60

Tabla 6

Lote n.º	Tratamiento	Tm de inicio (°C)	Entalpía (J/gdw)
B20747	Sin elastasa	60,45	26,21
B20749	Sin elastasa	63,27	29,02
B20752	Sin elastasa	61,32	22,40
B20753	Sin elastasa	60,48	22,10
B20759	Sin elastasa	59,78	28,57
B20837	Sin elastasa	60,66	28,79
B20842	Sin elastasa	60,25	25,06
B20844	Sin elastasa	60,12	27,82
B20849	Sin elastasa	60,13	24,57
B20855	Sin elastasa	60,81	22,08
40765	Sin elastasa	63,69	28,42
24750	Sin elastasa	60,22	24,71
B20747	Elastasa	60,92	28,95
B20749	Elastasa	62,01	26,43
B20752	Elastasa	60,15	23,27
B20753	Elastasa	59,66	29,30
B20759	Elastasa	58,36	28,19
B20837	Elastasa	60,72	24,17
B20842	Elastasa	60,41	24,84
B20844	Elastasa	61,25	29,07
B20849	Elastasa	60,48	31,49
B20855	Elastasa	60,46	27,34
40765	Elastasa	62,69	47,23
24750	Elastasa	62,26	35,62

La FIG. 9 es un gráfico que muestra ejemplos de termogramas de DSC para muestras emparejadas de muestras de tejido no tratadas con elastasa (líneas continuas) y muestras de tejido tratadas con elastasa (líneas discontinuas). El gráfico muestra la temperatura, en grados Celsius ("°C") en su abscisa (eje x) y el flujo de calor en vatios por gramo ("W/g") en su ordenada (eje y).

En el gráfico ilustrado, se muestran los datos correspondientes a muestras de tejido emparejadas de cuatro lotes de donantes respectivos. Para cada par de muestras de tejido, los datos sugieren que el tratamiento con elastasa tiene un efecto mínimo en la respuesta térmica de una muestra de tejido.

En general, el análisis por DSC mide las propiedades termoquímicas de la matriz tisular. Cuando el colágeno se calienta hasta una cierta temperatura, sus enlaces entrecruzados intramoleculares lábiles al calor se rompen, y la proteína experimenta una transición de una estructura cristalina altamente organizada a un estado de tipo gel aleatorio. Eso puede denominarse como desnaturalización. Los termogramas DSC dan información sobre la estructura de la matriz y su estabilidad. Por ejemplo, si el tejido se irradia con radiación gamma para la esterilización, la temperatura de desnaturalización inicial puede reducirse debido al daño gamma del tejido. Por otro lado, la reticulación típicamente aumenta la temperatura de desnaturalización inicial.

Efecto del tratamiento con elastasa sobre la susceptibilidad a la degradación enzimática

Se consideró el efecto del tratamiento con elastasa sobre la susceptibilidad de una muestra de tejido con respecto a la degradación enzimática.

Ejemplo 14

Se consideró el efecto del tratamiento con elastasa sobre la susceptibilidad de una muestra de tejido con respecto a la degradación con colagenasa. Se analizaron muestras de tejidos emparejadas de quince (15) lotes diferentes de donantes. Cada muestra emparejada incluía una muestra de tejido que había sido sometida a tratamiento con elastasa y una muestra de tejido que no había sido sometida a tratamiento con elastasa. Todas las muestras de tejido se habían sometido a liofilización con crioprotector después del tratamiento con elastasa. Las pruebas incluyeron la exposición de las muestras de tejido a colagenasa durante aproximadamente seis (6) horas. La Tabla 7 incluye los resultados de la prueba. Más particularmente, la tabla muestra el porcentaje de tejido remanente después de la exposición a colagenasa ("tejido remanente (%)").

Cada fila en la Tabla 7 corresponde a una muestra particular de las muestras de tejido ensayadas. La primera columna de la tabla ilustrada identifica el número de lote de donante del que procede la muestra de tejido correspondiente. La segunda columna identifica si la muestra de tejido correspondiente se expuso al tratamiento con elastasa. La designación "sin elastasa" significa que la muestra de tejido correspondiente no se expuso al tratamiento con elastasa. La designación "elastasa" indica que la muestra de tejido correspondiente se expuso al

tratamiento con elastasa. Las primeras quince filas de datos corresponden a muestras de tejido que no estuvieron expuestas al tratamiento con elastasa. Las últimas quince filas de datos corresponden a muestras de tejido que estuvieron expuestas al tratamiento con elastasa. La tercera columna muestra el porcentaje de tejido que quedó después de la exposición a la colagenasa.

5 Las primeras quince filas de datos en la tabla corresponden a los mismos números de lote de donante respectivos que las últimas quince filas de datos en la tabla.

10 Los datos en la tabla muestran que las muestras de tejido tratadas con elastasa eran ligeramente más susceptibles a la degradación con colagenasa que las muestras de tejido no tratadas con elastasa. En promedio, aproximadamente el 40,5% de las muestras de tejido no tratadas con elastasa permanecieron después de la degradación con colagenasa, mientras que, en promedio, aproximadamente el 34,2% de las muestras de tejido tratadas con elastasa permanecieron después de la degradación con colagenasa. Por lo tanto, la ATM tratada con elastasa probablemente será solo un poco más susceptible a la degradación de colágeno in vivo que la ATM tratada con elastasa.

Tabla 7

Lote n.º	Tratamiento	Tejido remanente (%)
B20747	Sin elastasa	55,6% ± 1,1%
B20749	Sin elastasa	82,6% ± 3,1%
B20752	Sin elastasa	43,5% ± 4,3%
B20753	Sin elastasa	37,7% ± 4,8%
B20759	Sin elastasa	46,9% ± 4,6%
B20837	Sin elastasa	49,7% ± 1,6%
B20842	Sin elastasa	48,5% ± 3,0%
B20844	Sin elastasa	44,3% ± 4,6%
B20849	Sin elastasa	16,3% ± 4,7%
B20855	Sin elastasa	50,7% ± 10,4%
B20908	Sin elastasa	37,2% ± 2,7%
B20900	Sin elastasa	13,7% ± 13,0%
B20911	Sin elastasa	17,9% ± 2,1%
B20914	Sin elastasa	29,7% ± 2,8%
B20915	Sin elastasa	32,8% ± 2,6%
B20747	Elastasa	35,3% ± 3,1%
B20749	Elastasa	61,2% ± 5,5%
B20752	Elastasa	47,0% ± 1,3%
B20753	Elastasa	31,3% ± 4,8%
B20759	Elastasa	36,2% ± 7,6%
B20837	Elastasa	45,9% ± 1,9%
B20842	Elastasa	34,2% ± 0,9%
B20844	Elastasa	34,5% ± 3,4%
B20849	Elastasa	7,4% ± 1,2%
B20855	Elastasa	47,1% ± 5,3%
B20908	Elastasa	41,1% ± 4,9%
B20900	Elastasa	7,1% ± 3,1%
B20911	Elastasa	15,2% ± 4,8%
B20914	Elastasa	44,6% ± 7,8%
B20915	Elastasa	25,1% ± 4,5%

Ejemplo 15

20 También se consideró el efecto del tratamiento con elastasa sobre la susceptibilidad de una muestra de tejido a la degradación con tripsina. De nuevo, se analizaron muestras de tejidos emparejadas de quince (15) lotes diferentes de donantes. Cada muestra emparejada incluía una muestra de tejido que había sido sometida a tratamiento con elastasa y una muestra de tejido que no había sido sometida a tratamiento con elastasa. Todas las muestras de

25 tejido se habían sometido a liofilización con crioprotector. Las pruebas incluyeron la exposición de las muestras de tejido a tripsina durante un período de tiempo determinado. La Tabla 8 incluye los resultados de la prueba. Más particularmente, la tabla muestra el porcentaje de tejido remanente después de la exposición a tripsina ("tejido remanente (%)").

30 Cada fila en la tabla ilustrada corresponde a una muestra particular de las muestras de tejido ensayadas. La primera columna de la tabla ilustrada identifica el número de lote de donante del que procede la muestra de tejido correspondiente. La segunda columna identifica si la muestra de tejido correspondiente se expuso al tratamiento con elastasa. La designación "sin elastasa" significa que la muestra de tejido correspondiente no se expuso al

tratamiento con elastasa. La designación "elastasa" indica que la muestra de tejido correspondiente se expuso al tratamiento con elastasa. La tercera columna muestra el porcentaje de tejido que quedó después de la exposición a tripsina.

- 5 Las primeras quince filas de datos en la Tabla 8 corresponden a los mismos números de lote de donante respectivos que las últimas quince filas de datos en la tabla. Las primeras quince filas de datos corresponden a muestras de tejido que no estuvieron expuestas al tratamiento con elastasa. Las últimas quince filas de datos corresponden a muestras de tejido que estuvieron expuestas al tratamiento con elastasa.
- 10 Los datos en la Tabla 8 muestran que el tratamiento con elastasa tiene muy poco efecto sobre la susceptibilidad de una muestra de tejido a la degradación con tripsina.

Tabla 8

Lote	Tratamiento	Tejido remanente (%)
B20747	Sin elastasa	83,8% ± 1,7%
B20749	Sin elastasa	92,0% ± 2,1%
B20752	Sin elastasa	85,2% ± 0,8%
B20753	Sin elastasa	85,1% ± 6,1%
B20759	Sin elastasa	83,5% ± 1,3%
B20837	Sin elastasa	89,1% ± 1,6%
B20842	Sin elastasa	87,9% ± 3,6%
B20844	Sin elastasa	82,2% ± 3,6%
B20849	Sin elastasa	76,4% ± 2,2%
B20855	Sin elastasa	85,5% ± 2,4%
B20908	Sin elastasa	81,7% ± 0,4%
B20900	Sin elastasa	76,9% ± 1,6%
B20911	Sin elastasa	56,2% ± 1,9%
B20914	Sin elastasa	58,9% ± 19,4%
B20915	Sin elastasa	83,8% ± 0,9%
B20747	Elastasa	93,0% ± 7,3%
B20749	Elastasa	90,7% ± 4,4%
B20752	Elastasa	84,0% ± 2,0%
B20753	Elastasa	82,7% ± 2,9%
B20759	Elastasa	80,0% ± 3,0%
B20837	Elastasa	83,6% ± 2,8%
B20842	Elastasa	87,7% ± 2,4%
B20844	Elastasa	86,3% ± 2,8%
B20849	Elastasa	80,6% ± 3,0%
B20855	Elastasa	83,4% ± 1,1%
B20908	Elastasa	83,1% ± 3,7%
B20900	Elastasa	76,7% ± 5,8%
B20911	Elastasa	64,7% ± 10,5%
B20914	Elastasa	72,2% ± 0,9%
B20915	Elastasa	77,3% ± 2,6%

15 Reacción del tejido al tratamiento con elastasa a lo largo del tiempo

Se realizó otro experimento para considerar la reacción de una muestra de tejido al tratamiento con elastasa a lo largo del tiempo.

20 **Ejemplo 16**

En este experimento, se procesaron muestras de tejido de dos lotes de donantes de tejido de acuerdo con la metodología patentada de LifeCell, analizada anteriormente, hasta el lavado de tejido (etapa (iii)). El tejido se cortó entonces en varios trozos de 3 centímetros por 7 centímetros. Algunos de esos trozos se aclararon con tampón Tris-HCl y se trataron con elastasa. Después, los cambios en las dimensiones de las muestras de tejido se midieron cada tres horas durante un intervalo de tiempo de treinta horas. La elastasa estuvo presente durante todo el intervalo de tiempo. También se midieron las dimensiones de las muestras de tejido correspondientes que no se habían tratado con elastasa. Estas dimensiones se identifican en las FIGS. 10A y 10B como medidas de "control".

30 Los gráficos en las FIGS. 10A y 10B muestran los resultados de este ensayo en muestras de tejido de dos lotes de donantes. Las abscisas de los gráficos corresponden al tiempo y las ordenadas corresponden al área de una superficie de las muestras de tejido. Los gráficos incluyen datos que corresponden al área de muestras de tejido tratadas con elastasa (indicadas por círculos sin sombrear) y al área de muestras de tejido no tratadas con elastasa

(indicadas por círculos sombreados) durante un transcurso de treinta horas.

5 La FIG. 10A indica que las muestras de tejido sin tratar con elastasa no experimentaron un cambio significativo en el área durante el período de treinta horas. Sin embargo, las muestras de tejido tratadas con elastasa experimentaron claramente un aumento en el área superficial durante el período de treinta horas. El aumento más notable se produjo entre aproximadamente la hora 9 y la hora 21. Posteriormente, se produjo un pequeño cambio en el tamaño de las muestras de tejido tratadas con elastasa.

10 La FIG. 10B también indica que las muestras de tejido sin tratar con elastasa no experimentaron un cambio significativo en el área durante el período de treinta horas. Sin embargo, las muestras de tejido tratadas con elastasa experimentaron claramente un aumento en el área superficial durante el período de treinta horas. El aumento más notable se produjo entre aproximadamente la hora 3 y la hora 15. Posteriormente, se produjo un pequeño cambio en el tamaño de las muestras de tejido tratadas con elastasa. En ambas FIGS. 10A y 10B, las muestras de tejido experimentaron muy poco crecimiento después de aproximadamente 18 horas. Después del tratamiento con elastasa, las muestras de tejido se aclararon con una solución de lavado de tejido, y no se observaron cambios dimensionales posteriores.

15 Se han descrito una serie de realizaciones de la presente divulgación. Sin embargo, se entenderá que se pueden hacer diversas modificaciones.

20 Por ejemplo, los usos de los tejidos tratados con elastasa pueden ser más expansivos que los descritos en el presente documento. La elastasa se puede mezclar con una diversidad de sustancias diferentes para formar una solución que se aplica a los tejidos. Los tejidos pueden tratarse sumergiéndolos en una solución de elastasa, vertiendo una solución sobre éste, recubriéndose con una solución de elastasa o utilizando cualquier otro procedimiento. La elastasa se puede colocar selectivamente en ciertas áreas de un tejido. Los injertos o implantes de tejido pueden implementarse usando múltiples trozos de tejido, habiéndose tratado uno o más de éstos con elastasa y no habiéndose tratado uno o más de éstos. El tiempo, las concentraciones, el grado de agitación, la temperatura ambiente y las condiciones de presión pueden variar considerablemente.

25

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para tratar un grupo de matrices de tejido acelular, que comprende:

- 5 proporcionar un grupo de matrices de tejido acelular (ATM) dérmico, en donde cuando una cantidad igual de fuerza de tracción se aplica a cada una de las ATM en el grupo, al menos alguna de las ATM en el grupo tiene un porcentaje de extensión diferente a otras ATM en el grupo; y
- 10 exponer una o más de las ATM del grupo a una solución que contiene elastasa durante un período de tiempo, dando como resultado la exposición una ATM modificada (mATM); y
- 15 controlar el tiempo de exposición y la concentración de elastasa en la solución para obtener un porcentaje de extensión deseado de la mATM cuando se coloca bajo una cantidad de fuerza de tracción, donde el porcentaje de extensión de las una o más mATM en la región inicial de la curva de tensión-deformación para la mATM que es resultado de una cantidad de fuerza de tracción es menor o igual que el porcentaje de extensión de las correspondientes ATM que es resultado de la cantidad de fuerza de tracción, y
- 20 donde las variaciones en el porcentaje de extensión a través de las mATM es menos que las variaciones en el porcentaje de extensión a través de las ATM.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, donde el porcentaje de extensión de una pluralidad de las una o más de las mATM varía del 14% al 24%, y la cantidad de fuerza de tracción es de 5 newtons/cm.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, donde el porcentaje de extensión de una pluralidad de las una o más de las mATM es del 19% y la cantidad de fuerza de tracción es de 5 newtons/cm.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones, donde la concentración de elastasa varía de 0,1 unidades/mililitro a 0,5 unidades/mililitro.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, donde la concentración de elastasa varía de 0,2 unidades/mililitro a 0,25 unidades/mililitro.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el período de tiempo varía de 12 horas a 24 horas.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además agitar una o más ATM del grupo y la solución mientras se expone una o más ATM del grupo a elastasa durante un período de tiempo.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde una o más de las ATM está hecha de tejido humano.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde una o más de las ATM está hecha de tejido de mamífero no humano.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, donde el tejido de mamífero no humano es tejido porcino.
11. El procedimiento de la reivindicación 9, donde el tejido de mamífero no humano es tejido bovino.
12. Una matriz de tejido acelular modificada hecha mediante el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
13. Una matriz de tejido acelular modificada producida de acuerdo con los procedimientos de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 para su uso en el tratamiento de un defecto tisular.
14. La matriz de tejido acelular modificada de la reivindicación 13, para su uso en el tratamiento de un defecto tisular, donde el defecto tisular es una hernia.

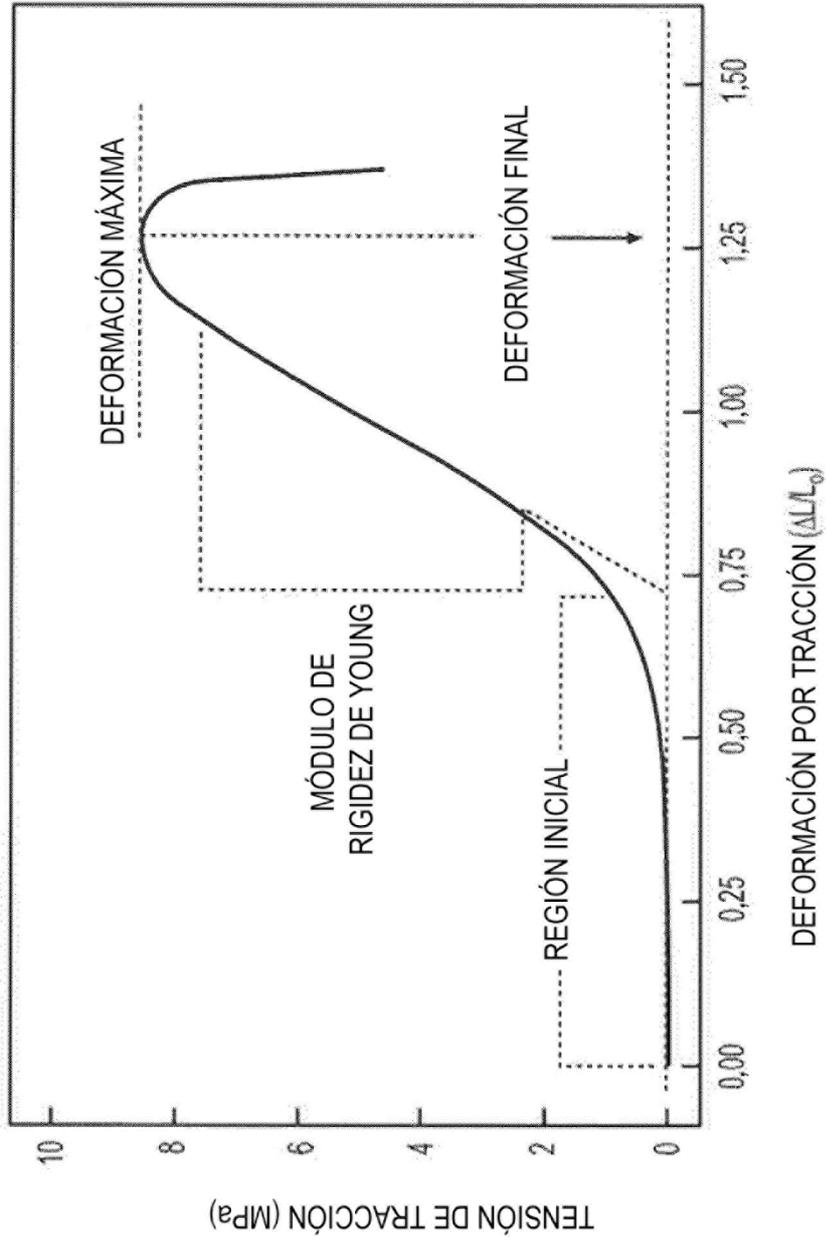


FIG. 1

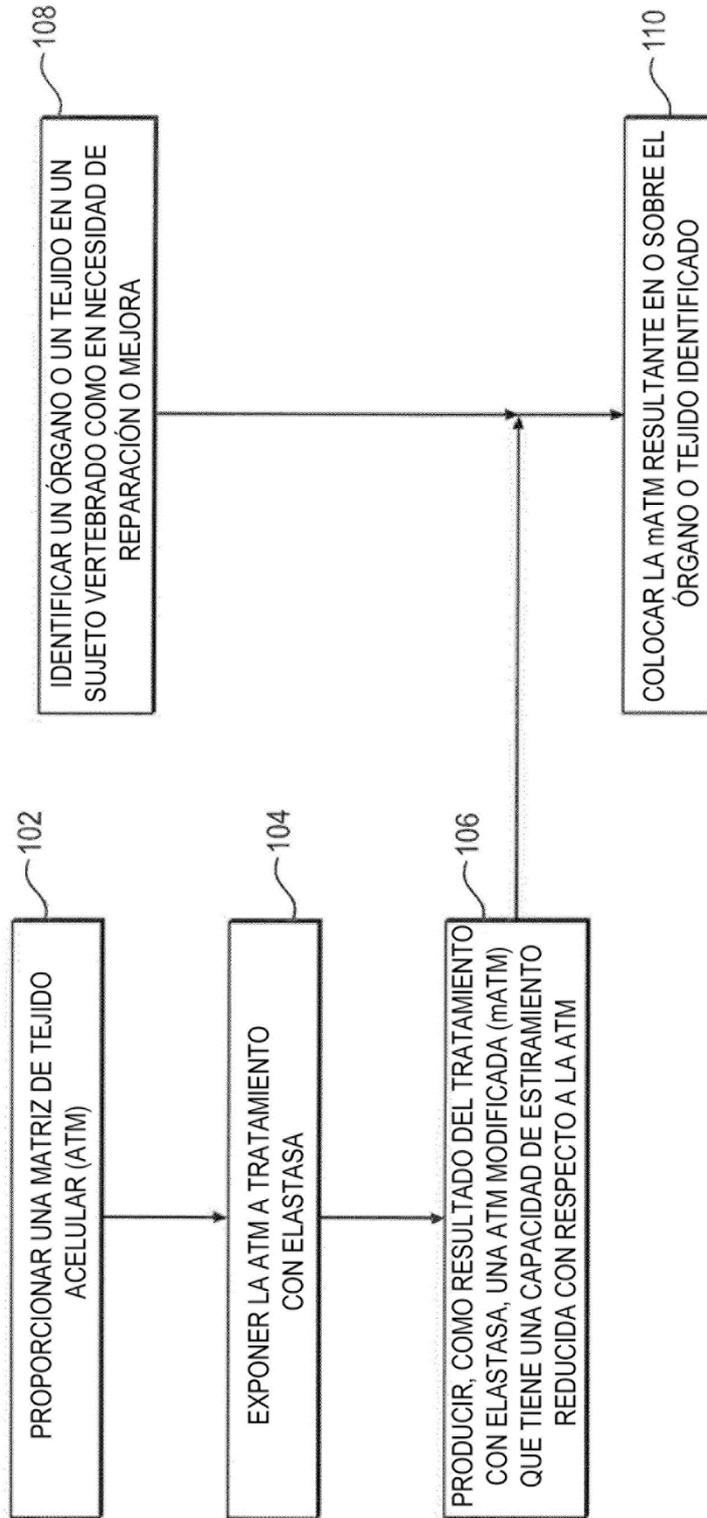


FIG. 2

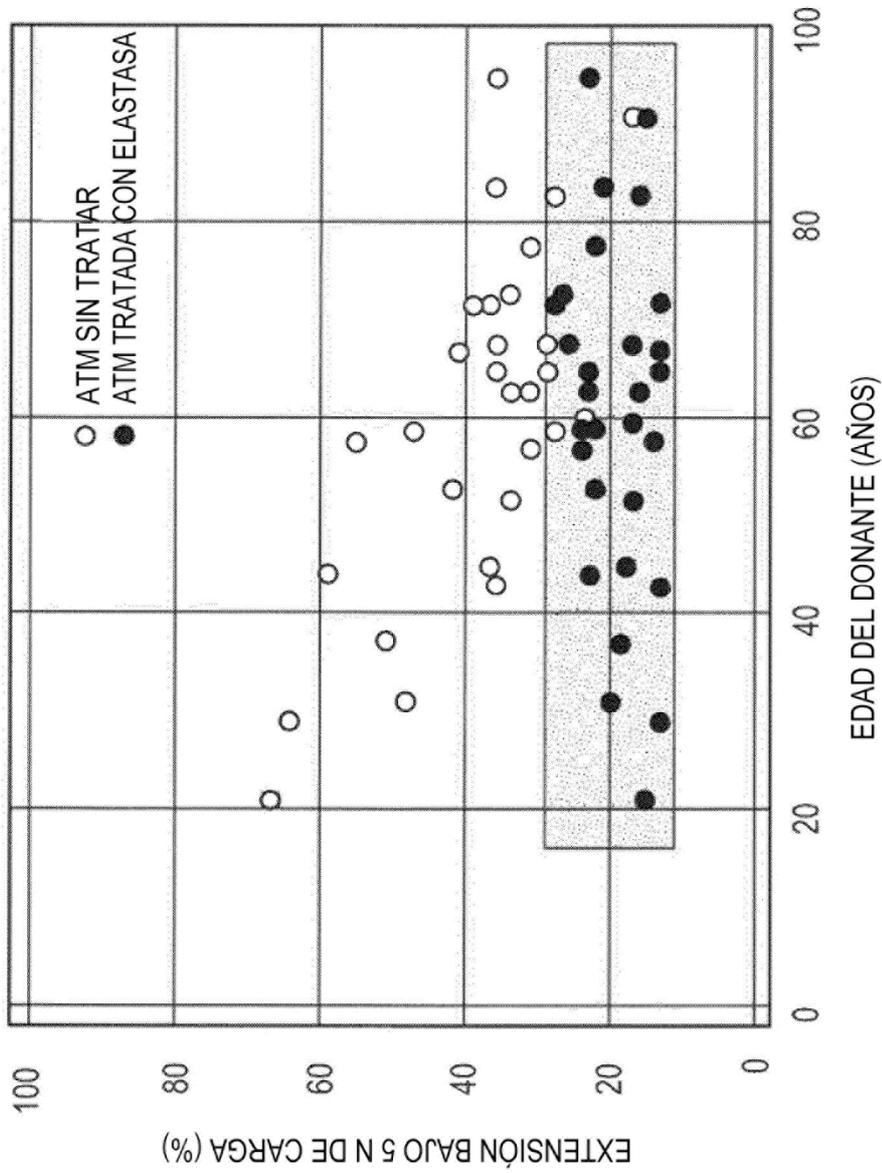


FIG. 3

30854-ELASTASA



FIG. 4A

30854+ ELASTASA

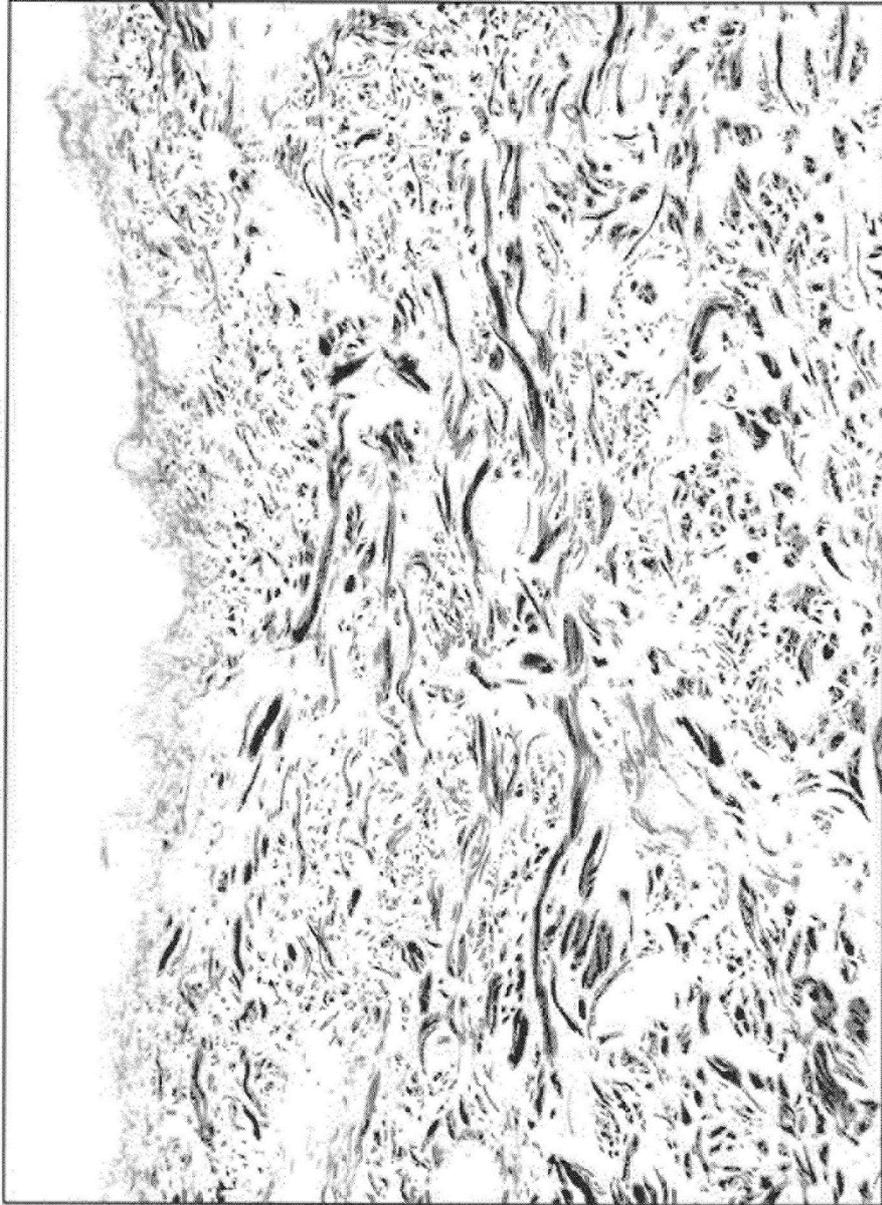


FIG. 4B

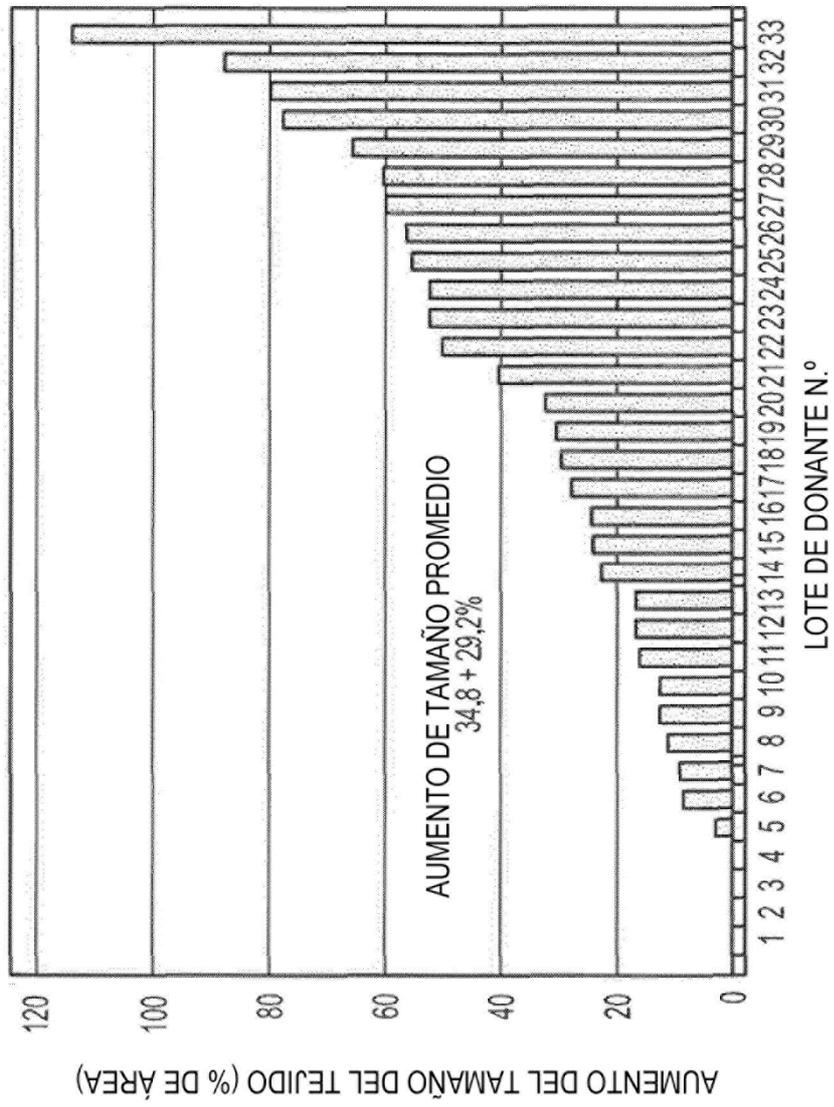


FIG. 5

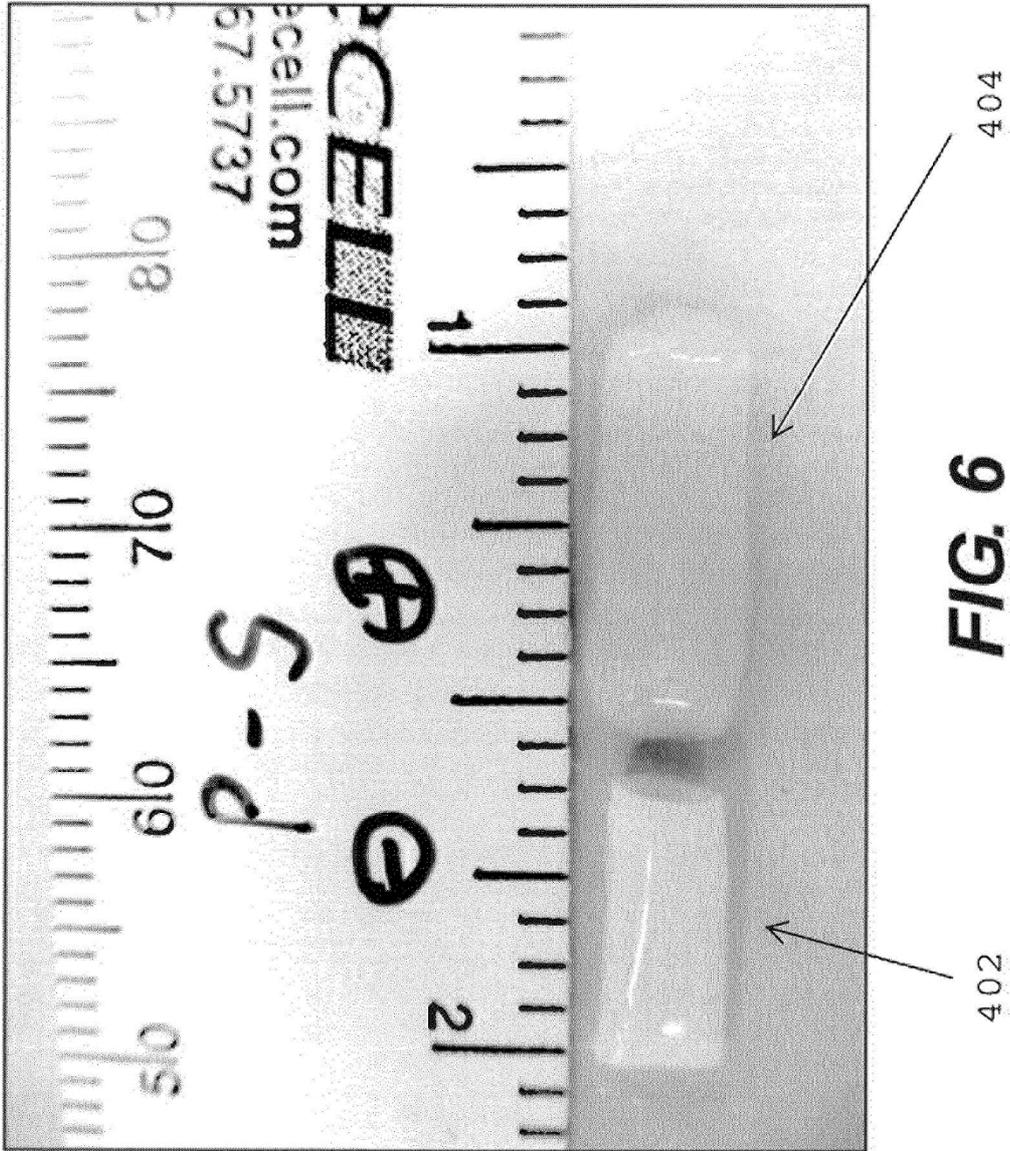


FIG. 6

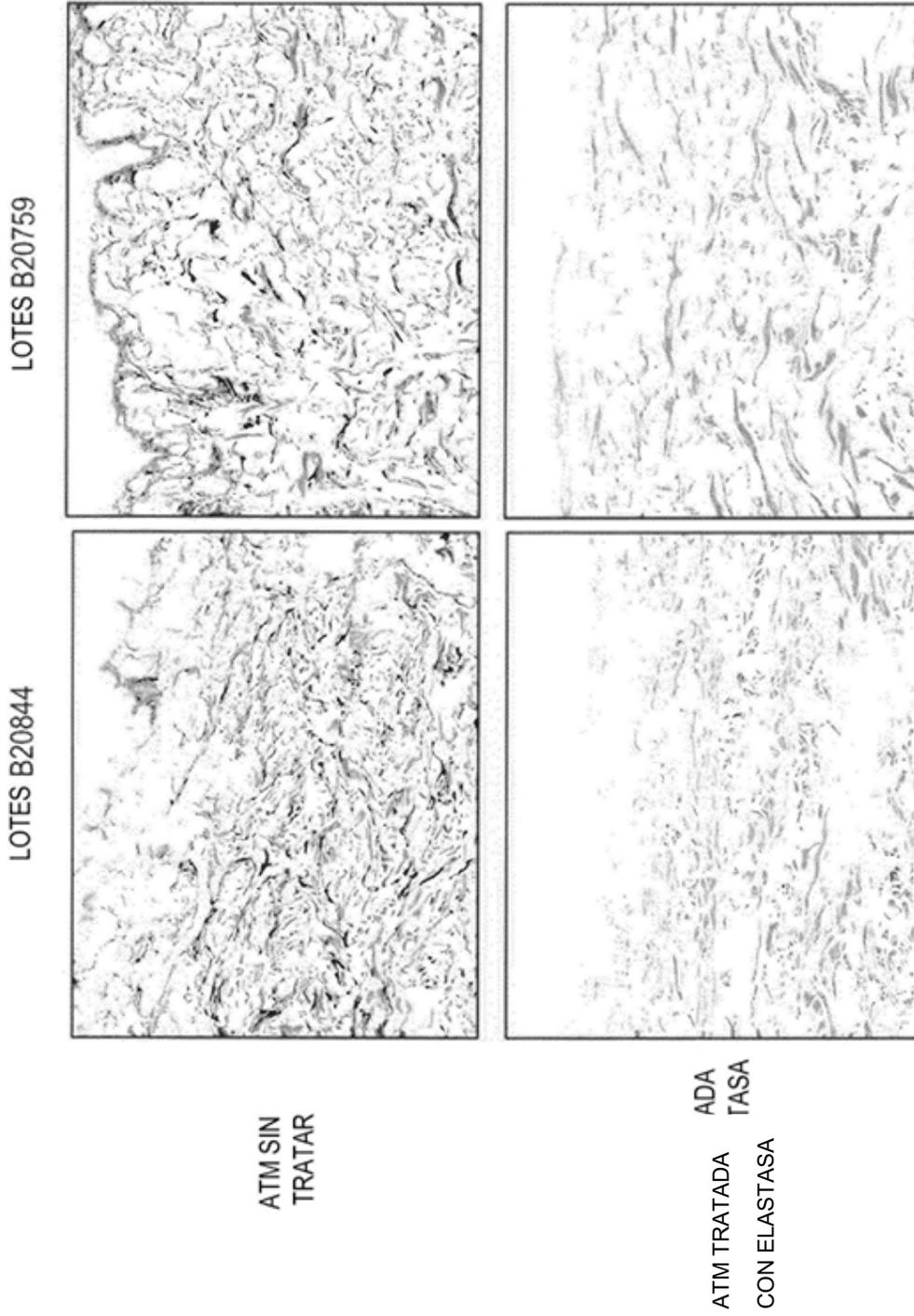
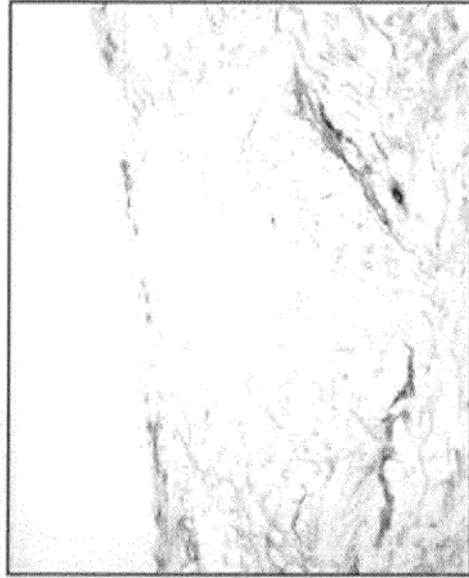
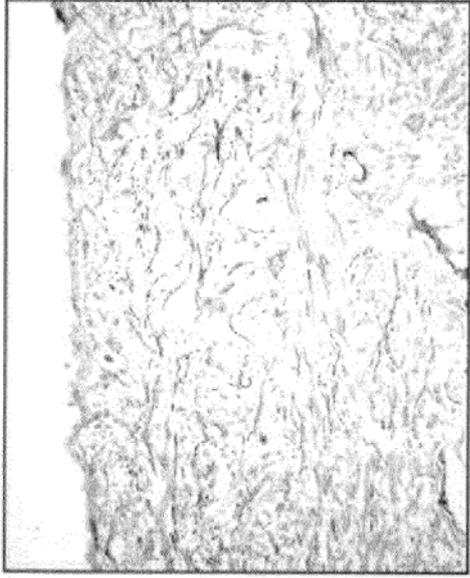
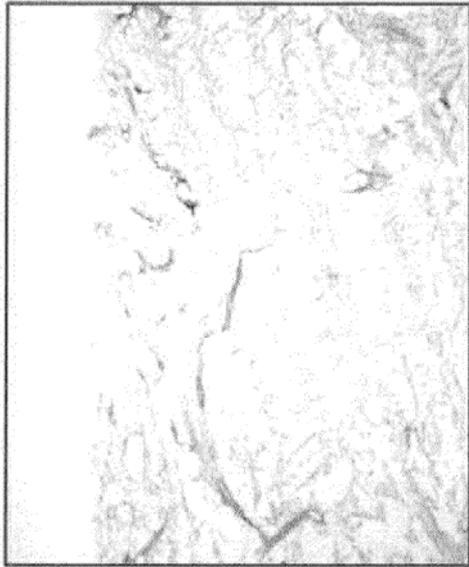
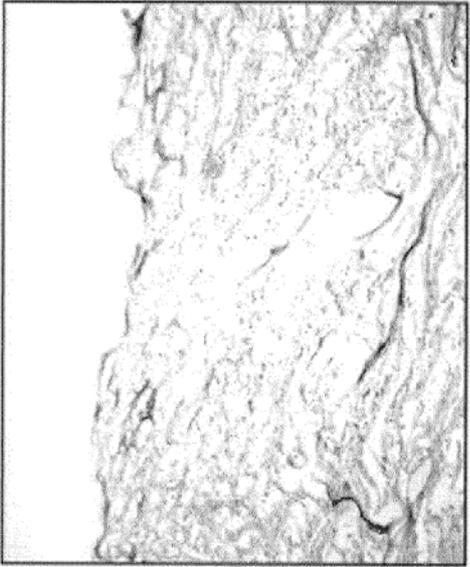


FIG. 7

LOTES B20759



LOTES B20844



ALLODERM
REGULAR

TRATADA CON
ELASTASA

FIG. 8

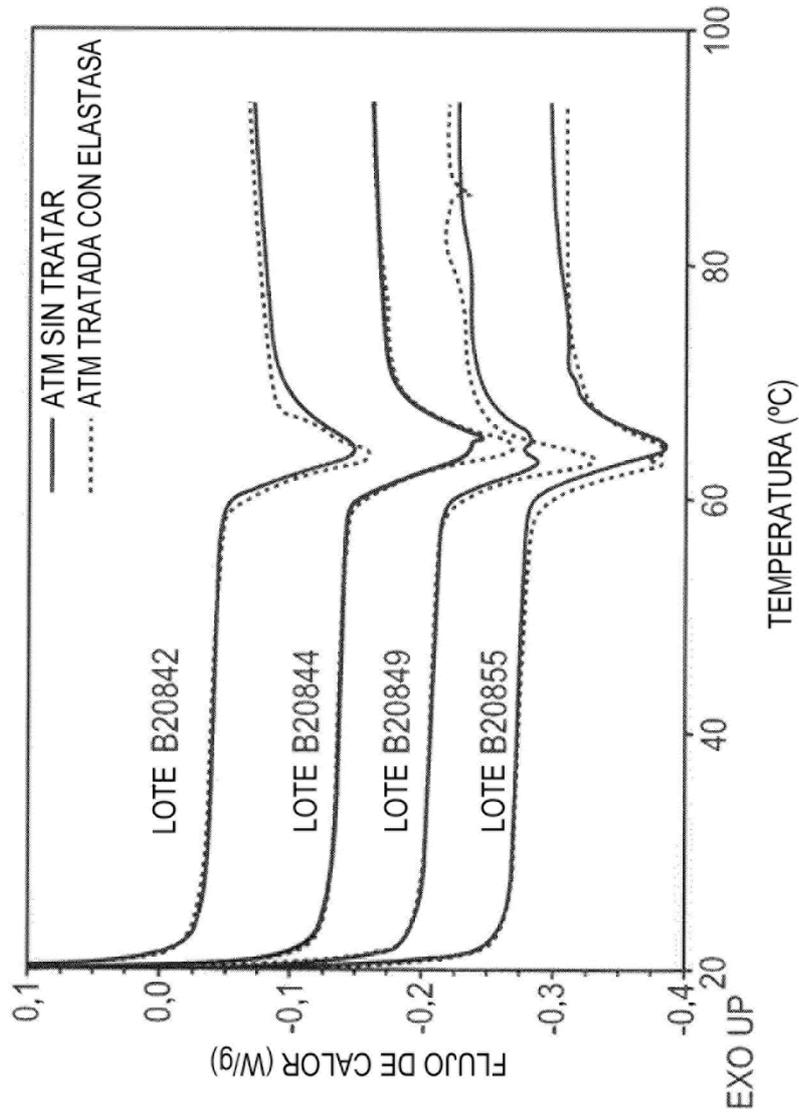


FIG. 9

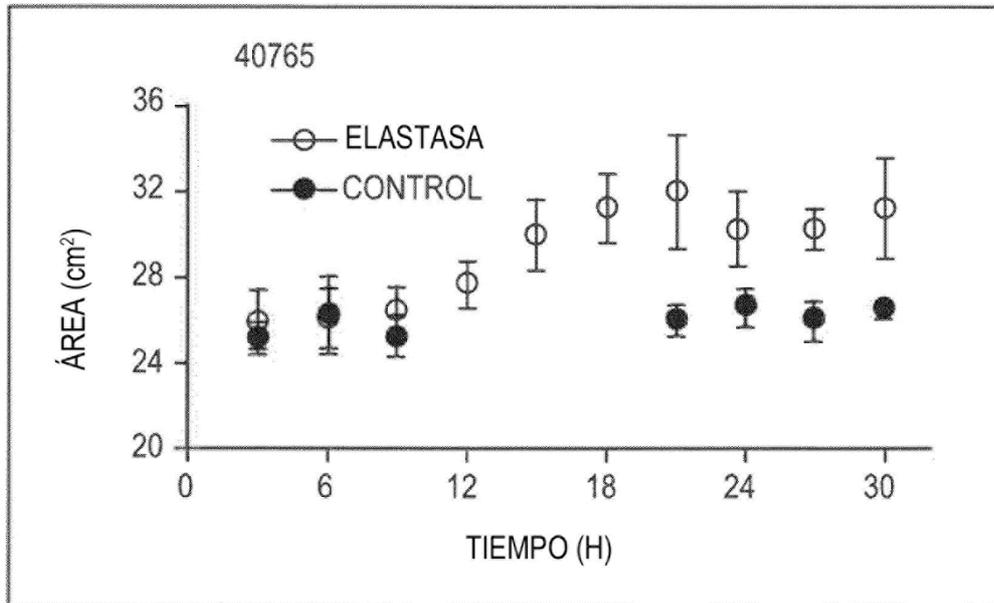


FIG. 10A

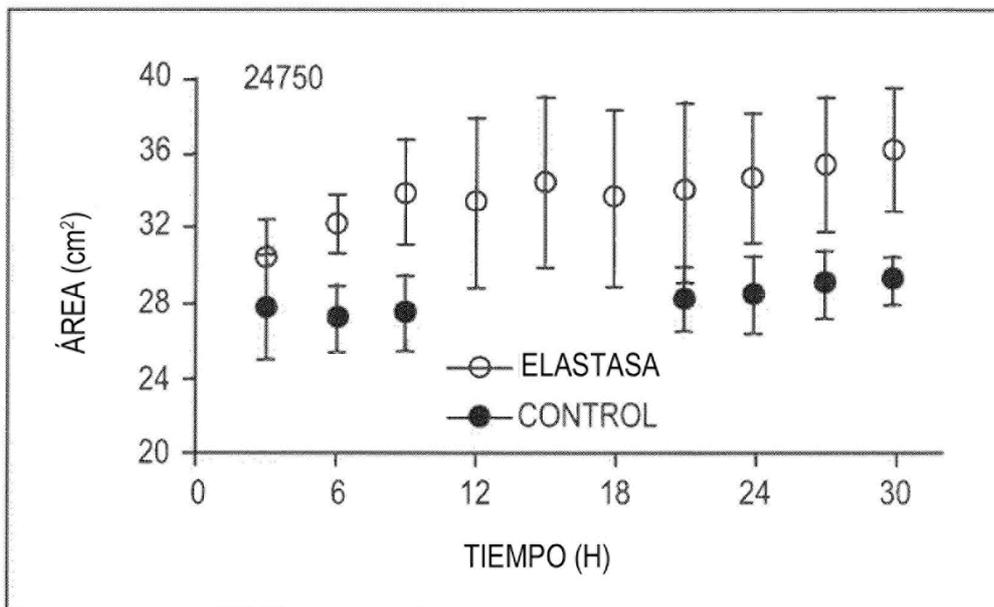


FIG. 10B