

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 759 445**

51 Int. Cl.:

**A61L 27/24** (2006.01)

**A61L 27/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.07.2011 PCT/US2011/043129**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.01.2012 WO12006390**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.07.2011 E 11738529 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2019 EP 2590691**

54 Título: **Procedimiento de formación de matrices de tejido**

30 Prioridad:

**08.07.2010 US 362424 P**

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

**11.05.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MONTEIRO, GARY y  
SUN, WENDELL**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 759 445 T3

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

## DESCRIPCIÓN

### Procedimiento de formación de matrices de tejido

5 La presente divulgación se refiere a matrices de tejido y, de manera más particular, a procedimientos para formar matrices de tejido y productos de tejido producidos de acuerdo con estos procedimientos.

10 Se utilizan varios productos derivados de los tejidos para regenerar, reparar o, en su defecto, tratar tejidos y órganos enfermos o dañados. Dichos productos pueden incluir injertos intactos y/o tejidos acelulares o acelulares reconstruidos (por ejemplo, matrices de tejido acelulares de piel, intestino, u otros tejidos, con o sin sembrado de células). No obstante, dichos tejidos generalmente poseen una forma definida por su tejido de origen. Por ejemplo, los productos dérmicos o intestinales generalmente incluirán láminas de materiales relativamente flexibles.

Para tratar ciertos defectos de tejidos u órganos, puede ser preferible crear formas o configuraciones predefinidas que se ajusten más a las estructuras anatómicas a tratar. Por lo tanto, se proporcionan los procedimientos para alterar la forma de las matrices de tejido, así como también las matrices de tejido producidas con la utilización de estos procedimientos.

15 El documento GB1073243 divulga un proceso para fabricar material de sutura. El documento WO2009/049568 divulga un procedimiento para fabricar una matriz acelular.

El documento FR2786400 divulga un proceso para preparar un material de colágeno entrecruzado.

### Sumario

La invención se define en las reivindicaciones.

20 De acuerdo con ciertas realizaciones, se proporciona un procedimiento para formar una matriz de tejido. El procedimiento comprende la selección de una matriz de tejido que contenga colágeno; la deshidratación parcial de la matriz de tejido; la aplicación de fuerzas mecánicas a la matriz de tejido para cambiar la orientación de al menos algunas fibras de colágeno que se encuentran dentro de la matriz de tejido; y la exposición de la matriz de tejido a la radiación.

25 En ciertas realizaciones, se proporciona un producto de tejido. El producto comprende una matriz de tejido extracelular que comprende colágeno, en la que la matriz de tejido extracelular posee una forma tridimensional estable formada por un proceso que comprende la deshidratación parcial de la matriz de tejido extracelular; la aplicación de fuerzas mecánicas a la matriz de tejido para reorientar al menos algunas fibras de colágeno que se encuentran dentro de la matriz de tejido; y la exposición de la matriz de tejido a la radiación.

30 En ciertas realizaciones, se proporciona un producto de tejido. El producto comprende una matriz de tejido extracelular que comprende fibras de colágeno, en la que al menos algunas fibras de colágeno dentro de la matriz poseen una orientación que es diferente a la orientación de las fibras en un tejido del que se produce la matriz y la matriz forma una forma tridimensional estable, y en la que la matriz posee una temperatura de desnaturalización como se la mide con calorimetría de barrido diferencial que se encuentra dentro de 5°C de temperatura de desnaturalización del tejido del que se produce la matriz.

35 En ciertas realizaciones, se proporciona un producto de tejido. El producto comprende una matriz de tejido extracelular que comprende fibras de colágeno, en la que al menos algunas fibras de colágeno dentro de la matriz tienen una orientación que es diferente a la orientación de las fibras en un tejido del que se produce la matriz, y en la que la matriz crea una forma tridimensional estable sin la utilización de agentes químicos de reticulación. La forma estable puede crearse al deshidratar parcialmente el producto de tejido y exponer el producto a la realización.

### Descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un producto de tejido con forma, de acuerdo con ciertas realizaciones.

La Fig. 2 es un producto de tejido con forma, de acuerdo con ciertas realizaciones.

La Fig. 3 es un producto de tejido con forma, de acuerdo con ciertas realizaciones.

45 La Fig. 4 es un termógrafo de calorimetría de barrido diferencial para un material dérmico acelular de seres humanos y un producto de tejido con forma producido de acuerdo con ciertas realizaciones.

Las Fig. 5A – 5D son micrografías de barrido de electrones para un material dérmico acelular de seres humanos y un producto de tejido con forma producido de acuerdo con ciertas realizaciones.

La Fig. 6 es un termógrafo de calorimetría de barrido diferencial para un material dérmico porcino acelular y un producto de tejido con forma producido de acuerdo con ciertas realizaciones.

5 Las Fig. 7A – 7D son micrografías de barrido de electrones para un material dérmico porcino acelular y un producto de tejido con forma de acuerdo con ciertas realizaciones.

La Fig. 8 es un gráfico de la tasa de difusión de albúmina de suero bovino (BSA) etiquetada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) a lo largo de láminas de matriz de tejido en una cámara de difusión de célula de Franz para un material dérmico porcino acelular y un producto de tejido con forma producido de acuerdo con ciertas realizaciones.

10 La Fig. 9 incluye imágenes microscópicas de fluorescencia de un material dérmico porcino acelular y un producto de tejido con forma luego de la exposición a BSA etiquetada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) en una cámara de difusión de célula de Franz.

La Fig. 10 es una foto de un material dérmico porcino acelular y producto de tejido con forma de acuerdo con ciertas realizaciones.

15 Las Fig. 11A – 11D son micrografías de barrido de electrones para una arteria porcina acelular y un producto de tejido con forma producido de acuerdo con ciertas realizaciones.

La Fig. 12A es una micrografía de barrido de electrones de un producto de tejido con forma producido de acuerdo con ciertas realizaciones.

20 La Fig. 12B es una micrografía de barrido de electrones de un producto de tejido con forma producido de acuerdo con ciertas realizaciones.

#### Descripción de ciertas realizaciones ejemplares

A continuación se hará referencia en detalle a ciertas realizaciones de ejemplo de acuerdo con la presente divulgación; algunos de estos ejemplos se ilustran en los dibujos adjuntos. De ser posible, se utilizarán los mismos números de referencia a lo largo de los dibujos para referirse a elementos o partes similares.

25 En la presente solicitud, la utilización del singular incluye el plural a menos que se especifique lo contrario. En la presente solicitud, la utilización de “o” significa “y/o” a menos que se especifique lo contrario. Además, la utilización del término “que incluye”, así como otras formas, tales como “incluye” e “incluido”, no son limitantes. Cualquier rango descrito en el presente documento se comprenderá como que incluye los extremos y todos los valores que hay entre los extremos.

30 Como se lo utiliza en el presente documento, “producto de tejido” y “producto de tejido con forma” se referirán a cualquier tejido humano o animal que contenga una matriz extracelular y que haya sido procesado para cambiar la orientación de al menos algunas fibras de colágeno dentro de la matriz extracelular. “Productos de tejido” puede incluir matrices de tejido acelulares o parcialmente descelularizadas, matrices de tejido descelularizadas que se han repoblado con células exógenas, y/o tejidos celulares que han sido procesados para cambiar la orientación de al menos algunas fibras de colágeno dentro de la matriz extracelular del tejido.

35 Se pueden utilizar varios tejidos humanos y animales para producir productos para tratar pacientes. Por ejemplo, se han producido varios productos de tejido para regeneración, reparación, incremento, refuerzo, y/o tratamiento de tejidos humanos que han sido dañados o perdidos debido a varias enfermedades y/o daños estructurales (por ejemplo, por un trauma, cirugía, atrofia, y/o desgaste y deterioro de largo plazo). Dichos productos pueden incluir, por ejemplo, matrices de tejido acelulares, aloinjertos de tejido o xenoinjertos, y/o tejidos reconstituidos (es decir, tejidos descelularizados al menos parcialmente que se han sembrado con células para producir materiales viables).

40 En ciertas realizaciones, estos productos pueden descelularizarse de forma completa o parcial para dar con matrices de tejido acelulares o materiales de tejido extracelulares que se utilizan en pacientes. Por ejemplo, varios tejidos, como la piel, intestino, hueso, cartílago, tejido nervioso (por ejemplo, fibras nerviosas o duramadre), tendones, ligamentos, u otros tejidos pueden descelularizarse de forma completa o parcial para producir productos de tejido que son útiles para los pacientes. En algunos casos, estos productos descelularizados pueden utilizarse sin el agregado de materiales celulares exógenos (por ejemplo, células madre). En ciertos casos, estos productos descelularizados pueden sembrarse con celdas de fuentes autólogas u otras fuentes, tales como fuentes xenogénicas o alogénicas, para facilitar el tratamiento. Los procesos apropiados para producir matrices de tejido acelular se describen más adelante.

50

Los productos de tejido se pueden seleccionar para proporcionar varias propiedades biológicas y mecánicas diferentes. Por ejemplo, una matriz de tejido acelular u otro producto de tejido pueden seleccionarse para permitir el crecimiento interno de tejido y remodelación para asistir en la regeneración de tejido que normalmente se encuentra en el lugar en que se implanta la matriz. Por ejemplo, una matriz de tejido acelular, cuando se la implanta dentro de la fascia o en su superficie, se puede seleccionar para permitir la regeneración de la fascia sin que haya fibrosis excesiva o formación de cicatrices. En ciertas realizaciones, el producto de tejido puede formarse a partir de ALLODERM® o STRATTICE™, que son matrices dérmicas acelulares humanas y porcinas, respectivamente. De forma alternativa, otras matrices de tejido acelulares apropiadas pueden utilizarse, como se describe en mayor detalle más adelante. Los procedimientos para formar tejidos con una matriz extracelular pueden utilizarse para procesar cualquier tipo de tejido de colágeno, y para cualquier producto de matriz de tejido. Por ejemplo, Badylak et al describen una cantidad de materiales de soporte biológicos, y los procedimientos de la presente divulgación se pueden utilizar para producir tejidos con una forma tridimensional estable al utilizar cualquiera de estos materiales, o cualquier otro material similar. Badylak et al., "Extracellular Matrix as a Biological Scaffold Material: Structure and Function," Acta Biomaterialia (2008), doi:10.1016/j.actbio.2008.09.013.

La mayoría de los tejidos, cuando se los cosecha de un donante animal o de un cadáver, retienen la forma general de la fuente de tejido original. Por ejemplo, un injerto de piel, cuando primeramente se lo disecciona de un donante, generalmente formará una lámina plana y flexible cuando se lo coloque en una superficie plana. De manera similar, la vejiga, el intestino delgado, los vasos sanguíneos, la duramadre, y otros materiales conservarán la forma de la fuente de tejido original. Además, cuando se los corta y procesa (por ejemplo, para producir una matriz de tejido acelular), la mayoría de los tejidos puede colocarse en una superficie plana para formar una lámina relativamente plana.

Para algunas aplicaciones, puede ser preferible alterar la forma de los productos de tejido. Por ejemplo, las matrices de tejido acelulares se implantan en varios lugares anatómicos diferentes, y puede ser beneficioso controlar la forma de las matrices de tejido para ajustarse más a la forma deseada cuando se lleva a cabo la implantación. Por ejemplo, las matrices de tejido acelulares u otros productos de tejido pueden implantarse alrededor de implantes mamarios; alrededor o en reemplazo de estructuras vasculares; alrededor o en reemplazo de estructuras lumenales (por ejemplo, uréteres, nervios, tejidos linfáticos, estructuras gastrointestinales); en la superficie o en reemplazo de válvulas cardíacas, pericardio, u otras estructuras cardíacas; dentro o en la superficie de materiales óseos o de cartílagos (por ejemplo, orejas, narices, superficies articulares, alrededor de estructuras dentales, o a lo largo de cualquier hueso corto o largo); y/o alrededor, en el revestimiento, como soporte, o en reemplazo de cualquier cavidad del cuerpo (por ejemplo, vejiga, estómago). No obstante, algunos procesos que pueden alterar la forma de un producto de tejido para formar una estructura tridimensional estable también pueden alterar la matriz de tejido en formas no deseables. Por ejemplo, la reticulación química puede utilizarse para formar una estructura tridimensional estable, pero la reticulación excesiva puede alterar las propiedades biológicas del tejido, y los agentes químicos de la reticulación pueden ser perjudiciales para los pacientes cuando se implantan en ellos. Por lo tanto, se proporcionan procedimientos para controlar la forma de los productos de tejido.

De acuerdo con ciertas realizaciones, se proporciona un procedimiento para formar una matriz de tejido. El procedimiento comprende la selección de una matriz de tejido que contiene colágeno; la deshidratación parcial de la matriz de tejido; la aplicación de fuerzas mecánicas a la matriz de tejido para cambiar la orientación de las fibras de colágeno dentro de la matriz de tejido; y la exposición de la matriz de tejido a la radiación. En ciertas realizaciones, se proporciona un producto de tejido. El producto comprende una matriz de tejido extracelular que comprende colágeno, en la que la matriz de tejido extracelular posee una forma tridimensional formada a partir de un proceso que comprende la deshidratación parcial de la matriz de tejido extracelular; la aplicación de fuerzas mecánicas a la matriz de tejido para reorientar las fibras de colágeno dentro de la matriz de tejido; y la exposición de la matriz de tejido a la radiación. En ciertas realizaciones, se proporciona un producto de tejido, que comprende una matriz de tejido extracelular que comprende fibras de colágeno, en la que la matriz de tejido extracelular produce una forma tridimensional estable que es diferente a una forma tridimensional de un tejido del que se produce la matriz, y en la que la matriz posee una temperatura de desnaturalización, como se mide con calorimetría de barrido diferencial que se encuentra dentro de 5°C de temperatura de desnaturalización del tejido del que se produce la matriz. En ciertas realizaciones, se proporciona un producto de tejido. El producto comprende una matriz de tejido extracelular que comprende fibras de colágeno, en la que al menos algunas fibras de colágeno dentro de la matriz poseen una orientación que es diferente a la orientación de las fibras en un tejido del que se produce la matriz, y en la que la matriz produce una forma tridimensional estable sin la utilización de agentes químicos de reticulación.

Como se indicó previamente, los productos de tejido de la presente divulgación comprenden una matriz extracelular que posee una forma tridimensional estable. La forma tridimensional puede elegirse para ajustarse a cualquier estructura anatómica y/o para llevar a cabo cualquier tarea estructural o funcional dentro del cuerpo de un paciente o en su superficie. Por ejemplo, las Fig. 1 – 3 son productos de tejido con forma, de acuerdo con ciertas realizaciones. La Fig. 1 es un dispositivo en forma de taza 10, con una superficie trasera convexa 12 y una superficie interna cóncava 14. Los productos en forma de taza pueden ser útiles para soportar implantes mamarios, por ejemplo, para el incremento de las mamas y/o la reconstrucción. Por ejemplo, la superficie interna 14 puede colocarse alrededor de un implante mamario y pegarse a la fascia, músculo o cualquier otro tejido que los rodea para ayudar a asegurar un implante mamario en una posición apropiada, para reducir o evitar la formación de cicatrices, o en su defecto, para

alterar la apariencia estética de un implante. Además, dichos dispositivos pueden utilizarse para reforzar cavidades del cuerpo (por ejemplo, la vejiga o el estómago).

Dichos dispositivos pueden modificarse, por ejemplo, puede tomar forma oblonga, completamente esférica, y/o más convexa o cóncava, como se requiera. Además, la forma puede realizarse como un producto con forma personalizada, por ejemplo, para ajustarse a requisitos anatómicos o estéticos específicos, o puede ser de tamaño regular para una aplicación en particular (por ejemplo, para ajustarse a implantes estándar, tales como un implante mamario, utilizado en conjunto con los productos de tejido con forma). Los productos de tejido pueden realizarse al juntar los bordes de tejido para formar una costura, por ejemplo mediante suturas, adhesivos, u otros mecanismos de conexión. Además, los productos de tejido pueden plegarse o en su defecto doblarse para crear una forma deseada.

La Fig. 2 es un dispositivo tubular 20 con un lumen 24. Si se forma a partir de una lámina de tejido, el dispositivo 20 puede incluir una costura 26 que se mantiene unida con suturas, adhesivos, u otros mecanismos de conexión. Los dispositivos tubulares pueden ser útiles para el tratamiento de enfermedades relacionadas con estructuras lumbinales del cuerpo y/o para el tratamiento de estructuras de tejido conectivo. Por ejemplo, una estructura tubular puede ser útil para tratar, reemplazar, o reforzar estructuras vasculares (por ejemplo, arterias o venas), como un conducto para ayudar en la reparación o regeneración de nervios, y/o para reemplazar, reparar, o regenerar tendones, ligamentos, o fascia. Los procedimientos de la presente divulgación pueden utilizarse para producir formas tridimensionales para cualquier estructura anatómica. La Fig. 3 es un dibujo de un producto de tejido con forma de nariz 28 que se produjo a partir de una matriz dérmica acelular con procedimientos de la presente divulgación. Se han producido los productos de tejido con tal forma. Los productos con formas que se ajusten a cualquier estructura anatómica deseada pueden producirse con los procedimientos descritos en el presente documento.

La matriz de tejido que contiene colágeno puede incluir una matriz de tejido acelular o una matriz de tejido que forma parte de un tejido intacto o parcialmente descelularizado. En algunas realizaciones, la matriz de tejido comprende una matriz de tejido dérmica. En ciertas realizaciones, el tejido se elige a partir de la fascia, el tejido del pericardio, la duramadre, el tejido del cordón umbilical, el tejido de placenta, el tejido de arteria, el tejido venoso, el tejido conectivo neural, el tejido de la vejiga, el tejido del uréter, y el tejido intestinal.

Como se mencionó previamente, el proceso de formación de productos de tejido incluye tejidos parcialmente deshidratados. Se ha descubierto que la deshidratación parcial de tejidos hace que la matriz extracelular de materiales colágenos sea más maleable, y por lo tanto permite reorientar las fibras de colágeno. No obstante, la deshidratación excesiva, por ejemplo, al secar en frío, puede hacer que los tejidos queden quebradizos, y por lo tanto, la deshidratación excesiva puede dañar los tejidos durante los siguientes pasos del proceso.

Pueden utilizarse varios procesos apropiados para deshidratar parcialmente la matriz de tejido. Por ejemplo, los procedimientos apropiados incluyen el secado con papel secante con toallas absorbentes de agua, la desorción con agua isotérmica con humedad controlada, la aplicación de fuerzas mecánicas a los tejidos, el centrifugado, y/o congelamiento controlado y/o direccional. Cualquier procedimiento apropiado puede utilizarse para deshidratar parcialmente la matriz siempre y cuando el procedimiento no produzca alteraciones en el tejido no deseables tales como los cambios en el colágeno o en otra estructura de proteína, la pérdida de factores de crecimiento, y/o reticulación en exceso.

En varias realizaciones, la cantidad de deshidratación se selecciona en función del tipo de tejido a procesar y las formas deseadas a producir. En algunas realizaciones, el tejido se deshidrata para producir una matriz de tejido que contiene entre 95% (en peso) y 50% (en peso) de contenido de agua. En otras realizaciones, el producto de tejido se deshidrata para producir un contenido de agua que se encuentra entre 80% (en peso) y 65% (en peso), 50 – 90%, 50 – 85%, 50 – 80%, 50 – 90%, 60 – 90%, 65 – 90%, o cualquier valor entre estos.

Luego de la deshidratación parcial, se aplican las fuerzas mecánicas a los tejidos o a matrices de tejido acelular para reorientar fibras de colágeno dentro de la matriz extracelular de los tejidos. Esto se puede llevar a cabo de varias maneras, siempre y cuando las fuerzas se orienten de manera tal que produzcan una forma final deseada. En algunas realizaciones, se produce un molde con una forma deseada, y una lámina con tejido o matriz de tejido acelular, que se ha deshidratado parcialmente, se pone en contacto con el molde. Luego se aplican las fuerzas a partes de la lámina para reorientar las fibras para producir un producto de tejido con una forma que se corresponde con la del molde. Por ejemplo, en algunas realizaciones, para producir un producto en forma de taza, como se ilustra en la Fig. 1, se utiliza un molde con una superficie convexa, y una lámina se estira o se tira sobre el molde y se queda en su lugar con la ayuda de suturas. De manera similar, para producir un producto tubular, como se ilustra en la Fig. 2, se selecciona una varilla de espiga u otra estructura tubular como molde, y una lámina de tejido o de matriz de tejido acelular se envuelve alrededor de la lámina.

La cantidad, dirección y/o modo de aplicación de la fuerza puede depender de la forma que se desea obtener. Por ejemplo, para una forma relativamente simple, puede ser suficiente colocar una lámina de tejido acelular sobre un molde con la forma deseada, y se puede aplicar fuerza adicional para estirar o comprimir la matriz. En otros casos, por ejemplo, para producir una forma más compleja, una lámina de matriz de tejido acelular puede colocarse en un

molde, y un segundo molde con una configuración correspondiente puede colocarse sobre la matriz de tejido acelular para comprimir la matriz y producir una forma deseada.

5 Por ejemplo, como se describió previamente, la Fig. 3 ilustra otro producto de tejido con forma 28, de acuerdo con ciertas realizaciones. El producto 28 posee forma de nariz, y puede utilizarse como un injerto de tejido para reparar o darle nueva forma a las estructuras nasales. El producto 28 se produjo al colocar una matriz dérmica acelular entre dos moldes con forma, para producir la forma deseada, e irradiar la matriz en la configuración con forma.

10 Luego de que se reorienten las fibras de colágeno, los productos de tejido se tratan para estabilizar las estructuras tridimensionales de la matriz extracelular. La estructura puede estabilizarse al exponer el producto de tejido a la radiación. La radiación puede producir un pequeño grado de reticulación de tejido suficiente para producir una estructura tridimensional estable. La estructura estable tenderá a ajustarse a una forma similar a la del molde (o la forma de la matriz en el momento de la irradiación), pero generalmente será suficientemente flexible para permitir que el producto de tejido se pueda manipular durante una cirugía y para funcionar como un injerto de tejido suave. Por ejemplo, un producto de tejido con forma de taza para un implante mamario será lo suficientemente flexible para ajustarse a un implante mamario y no producir una textura no deseada, y al mismo tiempo mantendrá una configuración relativamente en forma de taza en un estado de reposo. De manera similar, un producto tubular para un dispositivo vascular será lo suficientemente flexible para permitir dobladuras, anastomosis con un lugar vascular, y expansión bajo presión vascular, pero mantendrá una forma tubular cuando se encuentre en un estado de reposo (es decir, cuando no se le aplican fuerzas mecánicas externas a su superficie).

20 En varias realizaciones, la cantidad de radiación a la que se expone el producto puede ser de entre 5 Gy y 50 kGy, o entre 5 Gy y 20 kGy. En ciertas realizaciones, la radiación se aplica en una dosis de menos de 10 kGy, menos de 5 kGy, o menos de 1 kGy. Entre las formas apropiadas de radiación se puede incluir la radiación gama, la radiación eBeam, y la radiación de rayos X.

25 Como se notó previamente, los productos de tejido de la presente divulgación pueden formar una estructura tridimensional estable sin que se originen alteraciones no deseadas en la matriz de tejido. Por ejemplo, a pesar de que la reticulación puede ayudar en la conservación de una forma tridimensional, el exceso de reticulación puede alterar las propiedades biológicas de los productos de tejido. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el producto de tejido conservará una estructura tridimensional sin reticulación excesivo.

30 La reticulación de tejido puede medirse mediante un incremento en las temperaturas de desnaturalización de una matriz de tejido, como se mide con calorimetría de barrido diferencial. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los productos de tejido de la presente divulgación incluyen una matriz de tejido extracelular que produce una forma tridimensional estable que es diferente a la forma tridimensional de un tejido del que se produce la matriz, y en la que la matriz posee una temperatura de desnaturalización en un termógrafo de calorimetría de barrido diferencial que está dentro de 5°C de temperatura de desnaturalización del tejido del que se produce la matriz. En ciertas realizaciones, la temperatura de desnaturalización como se mide con calorimetría de barrido diferencial está dentro de 3°C, dentro de 2°C, o dentro de 1°C de la temperatura de desnaturalización del tejido del que se produce la matriz. En varias realizaciones, la temperatura de desnaturalización puede estar en un pico de la curva DSC, o puede identificarse como un promedio desde el inicio de la desnaturalización hasta la temperatura final, siempre y cuando se utilice el mismo procedimiento para identificar la temperatura de desnaturalización en la fuente y en los tejidos procesados. Además, debido a que los agentes químicos de reticulación pueden producir reticulación no uniforme y excesivo y/o pueden ser dañinos, el procedimiento de la presente divulgación permite la formación de una matriz que posee una forma tridimensional estable sin la utilización de agentes químicos de reticulación mediante la deshidratación parcial e irradiación.

45 Como se notó previamente, los "productos de tejido con forma" pueden incluir matrices de tejido acelulares o parcialmente descelularizadas, matrices de tejido descelularizadas que han reincorporado células exógenas, y/o tejidos celulares que han sido procesados para cambiar la orientación de al menos algunas fibras de colágeno dentro de la matriz extracelular del tejido. Por lo tanto, en varias realizaciones, los productos de tejido se pueden procesar (por ejemplo, para eliminar componentes celulares para producir matrices de tejido acelulares, y/o para eliminar materiales antigénicos), con la utilización de pasos que no sean los que se necesitan para formar el producto de tejido. En varias realizaciones, los procedimientos para formar productos de tejido pueden llevarse a cabo antes y/o después de otros pasos del proceso. Por ejemplo, para un producto de matriz de tejido acelular, la formación puede llevarse a cabo luego del proceso de descelularización o sobre el tejido intacto, el cual luego se procesa para eliminar células. Además, en algunas realizaciones, debido a que la radiación se utiliza para estabilizar la forma tridimensional, el paso de irradiación puede llevarse a cabo como parte de un paso de esterilización terminal para estabilizar la forma del producto de tejido y destruir patógenos. En otras realizaciones, la radiación se aplica al producto de tejido para producir una forma tridimensional estable, y el tejido se esteriliza con posteriores pasos de radiación y/u otros procesos de esterilización.

Además, los productos de tejido con forma de acuerdo con los procedimientos de la presente divulgación pueden embalsarse y/o rehidratarse. En ciertas realizaciones, los productos pueden estabilizarse con radiación de dosis bajas

y luego rehidratarse y reembalarse. Luego del embalaje, los productos pueden esterilizarse terminalmente con radiación adicional o con la utilización de otros procesos de esterilización.

5 En ciertas realizaciones, los productos de tejido producidos de acuerdo con los procedimientos de la presente divulgación poseen una permeabilidad que es diferente a la permeabilidad de las matrices de tejido de las que son hechos. En varias realizaciones, la permeabilidad puede ser en relación con líquidos, inclusive líquidos acuosos, tales como la sangre, fluidos serosanguíneos, orina, u otros fluidos corporales.

10 En ciertas realizaciones, los productos de tejido con forma tendrán una permeabilidad reducida en relación con líquidos que las matrices de las que son producidos. Los productos de tejido con una permeabilidad reducida pueden ser más apropiados para tratar lugares anatómicos expuestos a grandes cantidades de fluidos, o que deberían retener o excluir fluidos para llevar a cabo funciones normales. Por ejemplo, en la reparación, reemplazo, o regeneración de parte de estructuras vasculares o urinarias, puede ser preferible tener una permeabilidad reducida (o muy poca o ninguna), con lo que se evita la filtración de fluidos tales como sangre u orina mientras que ocurra la regeneración de tejido y el crecimiento interno celular. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, los productos de tejido con forma pueden incluir estructuras tubulares que son substancialmente impermeables a la sangre o estructuras en forma de bolsa que son impermeables a la sangre, orina, u otros fluidos.

15 Se entenderá que los beneficios y ventajas descritas previamente pueden relacionarse con una realización o pueden relacionarse a varias realizaciones. También se entenderá que la referencia a "un" elemento refiere a uno o más de esos elementos.

20 Si procede, los aspectos de cualquiera de los ejemplos y realizaciones descritas previamente pueden combinarse con los aspectos de cualquier otro ejemplo descrito para formar más ejemplos con propiedades comparables o diferentes y que traten problemas diferentes o similares.

25 Se entiende que la descripción previa de realizaciones preferidas se da solamente a modo de ejemplo y aquellas personas con habilidad en la técnica pueden llevar a cabo varias modificaciones. La especificación previa, los ejemplos, y los datos proporcionan una descripción completa de la estructura y uso de las realizaciones de ejemplo de la invención. A pesar de que se han descrito previamente varias realizaciones de la invención con cierto grado de particularidad, o con referencia a una o más realizaciones individuales, las personas expertas en la técnica pueden hacer varias alteraciones a las realizaciones divulgadas, sin que ello conlleve un alejamiento del alcance de la presente invención.

Experimento #1 – Reorientación de Fibras de Colágeno en la Dermis Humana Acelular

30 Proceso de Tejido para Descelularizar y Reorientar Fibras de Colágeno:

35 Se obtuvo la piel humada de donantes fallecidos, y la parte superior se dividió a un espesor de alrededor de 2 mm. La piel del donante se desepidermizó durante 17 horas a temperatura ambiente mediante la incubación en una solución de cloruro de sodio 1,0 M que contenía 0,5% (peso/volumen) de TRITON X100. El tejido se descelularizó mediante la incubación durante 22 horas en desoxicolato de sodio 2% (peso/volumen). La matriz de tejido desepidermizada y descelularizada se lavó en salina amortiguada con fosfato de Dulbecco (PBS, pH 7,5), y se congeló a -80°C para almacenamiento temporario. La dermis congelada se descongeló a temperatura ambiente (~22°C) y se lavó con solución PBS de Dulbecco durante la noche.

40 La matriz de tejido se deshidrató parcialmente mediante el secado con papel secante con GAMMA WIPES® esterilizados para lograr una hidratación de la matriz de tejido de  $3,12 \pm 0,22$  g de agua por gramo de masa seca (media  $\pm$  derivación estándar, N = 3) o un contenido de agua final de 75,7% (en peso). La deshidratación parcial representó la remoción de ~51% del agua en la matriz de tejido. El proceso de secado también se utilizó para aplicar presión mecánica (compresión) a la matriz de tejido parcialmente deshidratada para producir la reorientación de fibras de colágeno dentro de la matriz de tejido.

45 Se sellaron muestras de matriz de tejido deshidratadas y reorientadas en bolsas de película plástica esterilizadas. Las bolsas de película plástica luego se sellaron en bolsas de película con película secundarias y luego se irradiaron con 500 Gy de radiación gamma durante 35 minutos. Luego de la radiación, la matriz de tejido se rehidrató en PBS. El contenido de agua de las matrices de tejido rehidratado fue de  $4,92 \pm 0,31$  gramos por gramo de masa de tejido seca (N = 3) u 83,1 (en peso), lo que representa un aumento del 57,7% durante la rehidratación en PBS. Las matrices de tejido humanas rehidratadas presentaron una porosidad estimada de alrededor de  $88 \pm 1\%$  (N = 3).

50 Calorimetría de Barrido Diferencial:

La calorimetría de barrido diferencial (DSC, por sus siglas en inglés) se utilizó para evaluar las diferencias entre matrices de tejido de control (descelularizadas pero no sometidas a la reorientación de colágeno) y producto de tejido con forma rehidratado. La Fig. 4 es un termógrafo de calorimetría de barrido diferencial para un material dérmico humano acelular de control y un producto de tejido con forma. Como se ilustra en la figura, los termógrafos para el

material de control y el producto de tejido con forma fueron muy similares, con una temperatura de desnaturalización similar que indica poca reticulación de colágeno o daño. Por lo tanto, la reorientación de fibra de colágeno con deshidratación parcial y radiación de dosis gamma baja no alteraron significativamente la estructura y estabilidad de fibras de colágeno y la matriz de tejido.

5 Microscopía de Electrones:

Las matrices de tejido rehidratadas se fijaron en glutaraldehído 2% durante 24 horas y se deshidrataron de manera secuencial en 25%, 50%, 75%, 90%, 98% y 100% (v/v) de soluciones de etanol. La duración de cada paso de deshidratación de etanol fue de al menos 2 horas. Las muestras deshidratadas con etanol se secaron en hexametildisilazano y luego se recubrieron por pulverización con oro antes de la observación del microscopio electrónico de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) bajo 10 kilovoltios.

Las Fig. 5A – 5D son micrografías de barrido de electrones para controlar material dérmico humano acelular (Figuras 5A y 5B) y un producto de tejido con forma (Figuras 5C y 5D). Las imágenes de bajo aumento (Figuras 5A y 5C) muestran que el tratamiento tuvo como resultado el reordenamiento de fibras de colágeno. Además, las imágenes de aumento superior (Figuras 5B y 5D) demuestran que el proceso no alteró las estructuras de fibra de colágeno.

15 Experimento #2 – Reorientación de Fibras de Colágeno en Dermis Porcina Acelular

Proceso de Tejido para Descelularizar y Reorientar Fibras de Colágeno:

La piel porcina se dividió para eliminar la epidermis y la grasa subcutánea. El tejido restante tuvo un grosor de  $1,9 \pm 0,2$  mm (N = 5). El tejido se descelularizó durante 24 horas a temperatura ambiente, y luego se lavó tres veces con PBS durante 2 horas de cada lavado. La matriz dérmica descelularizada se deshidrató parcialmente al secarla con papel secante con GAMMA WIPES® esterilizados para lograr un nivel de hidratación del tejido de  $2,34 \pm 0,37$  gramos de agua por gramo de masa de tejido seco o un contenido de agua final de 70% (en peso). La deshidratación eliminó ~43% de agua de tejido. El proceso de secado con papel secante también se utilizó para aplicar presión mecánica (compresión) a la matriz de tejido para lograr la reorientación de las fibras de colágeno dentro de la matriz de tejido.

Las muestras de tejido se sellaron en bolsas de película plástica esterilizadas. Las bolsas plásticas se sellaron en bolsas de película con película secundarias y se irradiaron con 500 Gy de radiación gamma durante 35 minutos. Luego de la irradiación gamma, la matriz dérmica porcina se rehidrató en PBS. La matriz de tejido completamente rehidratada poseía una hidratación de  $2,84 \pm 0,38$  gramos de agua por gramo de masa de tejido seco (N = 10) o un contenido de agua de 74% (en peso). La matriz de dermis porcina rehidratada tenía una porosidad estimada de alrededor de  $80 \pm 2\%$  (N = 10) de acuerdo con el contenido de agua en la matriz de tejido.

30 Calorimetría de Barrido Diferencial:

Se utilizó calorimetría de barrido diferencial (DSC, por sus siglas en inglés) para evaluar las diferencias entre las matrices de tejido de control (descelularizadas pero no sometidas a la reorientación de colágeno) y el producto de tejido con forma rehidratado. La Fig. 6 es un termógrafo de calorimetría de barrido diferencial para un material dérmico porción acelular de control y un producto de tejido con forma. Como se ilustra en la figura, los termógrafos para el material de control y el producto de tejido con forma fueron similares, ya que el producto de tejido con forma tenía una temperatura de desnaturalización en el termógrafo que se cambió a una temperatura ligeramente superior (de 1 a 2 °C). Esta pequeña modificación originada por la reorientación de colágeno y la irradiación gamma fue una indicación de una pequeña cantidad de reticulación de colágeno.

Microscopía de Electrones:

Las muestras rehidratadas se fijaron, deshidrataron y prepararon en la forma descrita en el Ejemplo 1 para la observación SEM. Las Fig. 7A – 7D son micrografías de barrido de electrones para un material dérmico porcino acelular de control (Figuras 7A y 7B) y un producto de tejido con forma (Figuras 7C y 7D). Las imágenes de bajo aumento (Figuras 7A y 7C) muestran que el tratamiento tuvo como resultado el reordenamiento de fibras de colágeno. Además, las imágenes de aumento superior (Figuras 7B y 7D) demuestran que el proceso hizo que las fibras de colágeno estuviesen más cerca entre sí, pero no alteraron las estructuras de fibra de colágeno.

Permeabilidad del Tejido:

Una cámara de difusión de célula de Franz con una abertura de 0,9 cm se utilizó para medir la tasa de difusión de BSA etiquetada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) a lo largo de láminas de matriz de tejido. La concentración de FITC-BSA se conservó en 10 µg/ml en la cámara del donante. La fluorescencia de la solución en la cámara receptora se midió cada hora durante 7 horas. Al completarse el análisis de difusión, las muestras de tejido se crio-seccionaron a porciones de 10 micrones y se las observó con un microscopio de fluorescencia.

La Fig. 8 es un gráfico de la tasa de difusión de BSA etiquetada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) a lo largo de láminas de matriz de tejido en una cámara de difusión de célula de Franz para un material dérmico porcino acelular y un producto de tejido con forma producido como se describe en el presente ejemplo. La Fig. 9 incluye imágenes microscópicas de fluorescencia de un material dérmico porcino acelular y un producto de tejido con forma, respectivamente, luego de la exposición a BSA etiquetada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) en una cámara de difusión de célula de Franz.

Como se ilustra, en el gráfico de tasa de difusión y en las imágenes microscópicas, la tasa de difusión a través del producto de tejido con forma fue significativamente menor a la tasa de difusión a través de la matriz dérmica porcina acelular que no había sido reformada. Estos datos demuestran que el procedimiento de reordenamiento de colágeno puede modificar la permeabilidad de una matriz de tejido, y puede reducir la permeabilidad de matrices de tejido.

#### Experimento #3 – Formación de Láminas Dérmicas Porcinas Acelulares Planas en Formas 3D

La piel porcina se mojó en solución de hidróxido de calcio 0,2% durante 5 días para aflojar la epidermis y cabello, y la epidermis y el cabello se removieron mecánicamente mediante el raspado. La dermis desepidermizada y sin cabello se neutralizó con ácido acético y se lavó de forma extensiva en agua destilada durante 48 horas. La dermis limpia posteriormente se descelularizó al mojarla en una solución con solución de desoxicolato de sodio 2% (peso / volumen) y 10 mM ETDA durante 40 horas. Luego de la descelularización, la matriz dérmica (con un grosor de ~ 2 mm) se lavó en solución PBS para eliminar el detergente residual.

Para darle forma a la lámina dérmica de una matriz de tejido curva 3D, la lámina se deshidrató parcialmente mediante el secado con papel secante con GAMMA WIPES®. La lámina posteriormente se colocó en un molde con una forma semiesférica bajo tensión (~5 N). La lámina posteriormente se colocó firmemente en su lugar con suturas. El material montado se empaquetó en una bolsa de película con película y se irradió con 16,7 kGy de radiación eBeam. La dermis tratada con e-Beam se eliminó del molde y se la rehidrató completamente en la solución PBS. Una lámina sin tratar de dermis porcina acelular 90 y productos de tejido con forma 92 se ilustran en la Fig. 10. Como se ilustra en la figura, el producto de tejido con forma conservó una forma de taza tridimensional estable, pero siguió siendo flexible y daba la sensación de ser muy similar a la lámina acelular no tratada.

#### Experimento #4 – Formación de Láminas Dérmicas de Humanos en Formas 3D

Se obtuvo piel humana de un donante muerto. La epidermis se eliminó con una dermatoma. El tejido dérmico (~2,5 mm) se descelularizó con desoxicolato de sodio 2% (peso / volumen) durante 24 horas y se lavó en PBS durante 20 horas para remover residuos de detergente. Una parte de la lámina dérmica descelularizada se secó con papel secante y se montó a un cono de plástico ( $\phi = 4$  cm). Se ubicó un segundo cono de plástico en la parte superior para asegurar la matriz dérmica en la configuración de cono. La construcción se empaquetó en una bolsa de película con película y se irradió con e-Beam con una dosis de 16,7 kGy.

La dermis tratada con e-Beam retuvo su forma cónica luego de ser removida de los moldes de plástico (no ilustrado). Se produjeron otras formas al doblar láminas dérmicas para producir configuraciones anguladas / dobladas (no se ilustran los resultados).

#### Experimento #5 – Reorientación de Fibras de Colágeno en Arteria Porcina Acelular

Las arterias carótidas porcinas (de 7 a 8 cm de longitud) se diseccionaron de los cuellos de los animales y se separaron en dos grupos de acuerdo con su diámetro externo (Grupo A, de 5 a 6 mm; Grupo B, de 7 a 8 mm). Las arterias diseccionadas se lavaron durante 30 min con TRITON X100 0,5% (volumen / peso) para remover la sangre. Las arterias se congelaron y descongelaron 3 veces en una solución de desoxicolato de sodio 2% con un cóctel de antibióticos (50  $\mu$ g/ml de penicilina, 1,25  $\mu$ g/ml de anfotericina B, y 50  $\mu$ g/ml de estreptomycin). Luego de los ciclos de congelamiento y descongelamiento, las arterias se descelularizaron a 37°C durante 96 horas en la misma solución de desoxicolato de sodio. Las arterias descelularizadas se lavaron 4 veces (2 horas por cada lavado) con PBS de Dulbecco con 50 u/ml de penicilina, 1,25 ug/ml de anfotericina B, y 50 ug/ml de estreptomycin. La mitad de las arterias procesadas del Grupo A y del Grupo B se almacenaron a 4°C en PBS con los antibióticos. La otra mitad de las arterias procesadas se sometió a irradiación gamma. Se insertó un drenaje quirúrgico de 5 mm en cada arteria como medio de apoyo, y luego la arteria se secó con papel secante con GAMMA WIPES®. El proceso de secado con papel secante también se utilizó para aplicar presión mecánica (compresión) a la matriz de tejido para lograr la reorientación de fibras de colágeno dentro de la matriz de tejido.

Luego del secado con papel secante, las arterias se empaquetaron en bolsas de película plástica esterilizadas y bolsas de película con película secundarias. Las arterias se irradiaron con 1 kGy de radiación gamma. El proceso de descelularización eliminó las células endoteliales de la túnica íntima, células de músculos suaves de los medios, y células fibroblastos de la túnica externa. Las arterias descelularizadas comprendieron matrices de tejido de elastina y de colágeno muy flojas que podrían colapsar en su propio peso, mientras que el producto con forma (deshidratado y con reorientación de colágeno) conservó un lumen abierto con una estructura tubular cuando se lo colocó en una superficie plana.

Las Fig. 11A – 11D son micrografías de barrido de electrones para una arteria porcina acelular (Figuras 11A y 11B) que no se pudieron secar con papel secante e irradiar, y para un producto de tejido con forma (Figuras 11C y 11D) que comprenden una arteria acelular que ha sido secada con papel secante e irradiada. La deshidratación parcial y radiación incrementaron la fuerza de la matriz arterial, lo que evita que la estructura tubular colapse en su propio peso. Además, como se puede apreciar en las Fig. 11A – 11D, las matrices de tejido arterial tratadas tenían fibras de colágeno más densas que lo que habían sido reorientadas durante el secado con papel secante.

#### Experimento #6 – Estabilización de Matrices Humanas y de Dermis Porcina Enrolladas

Se obtuvieron matrices de tejido dérmico ALLODERM® y STRATTICE™ de LifeCell Corporation. ALLODERM® es una matriz dérmica humana acelular secada en frío, y STRATTICE™ es una matriz dérmica porcina acelular hidratada. Las matrices de tejido ALLODERM® se rehidrataron de manera aséptica en PBS y se lavaron tres veces para eliminar crio-protectores. Las matrices dérmicas humanas rehidratadas se almacenaron a 4°C hasta que estuvieron listas para utilizar. Las matrices de tejido STRATTICE™ se lavaron de manera aséptica en PBS tres veces para eliminar las soluciones de preservación de tejido.

Luego de la hidratación, las matrices de tejido dérmicas porcinas y humanas fueron láminas flexibles que pudieron haberse enrollado en una forma cilíndrica. No obstante, las láminas enrolladas se hubieran doblado fácilmente a láminas planas cuando se colocasen en una solución salina. Para estabilizar los rollos de lámina, las láminas dérmicas humanas y porcinas se secaron con papel secante a un contenido de agua de alrededor del 75% (en p/p) para ALLODERM® y 70% (en p/p) para STRATTICE™. Las láminas secadas con papel secante (parcialmente deshidratadas) se enrollaron con tubos de drenaje quirúrgicos. Las láminas enrolladas se empaquetaron en bolsas de película plástica esterilizadas y bolsas de película con película secundarias y se las irradió con 1 kGy de gamma. Luego de la irradiación gamma, las matrices dérmicas enrolladas no se doblaron cuando se las colocó en soluciones salinas.

Las muestras se prepararon para el análisis SEM, como se describe en el ejemplo 1. Las Fig. 12A y 12B son imágenes SEM de matrices de tejido acelular dérmico humanas con forma y matrices de tejido acelular dérmico porcinas con forma, respectivamente. Como se ilustra en las figuras, las fibras de colágeno presentaron áreas de compresión 110 y alargamiento 120 donde las fibras se reorientaron de manera estable para formar una estructura tubular.

#### Matrices de Tejido Acelular

El término “matriz de tejido acelular”, como se lo utiliza en el presente documento, generalmente se refiere a cualquier matriz de tejido que se encuentra sustancialmente libre de células y/o componentes celulares. La piel, partes de la piel (por ejemplo, la dermis), y otros tejidos como los vasos sanguíneos, válvulas cardíacas, fascia, cartílagos, huesos, y tejido conectivo nervioso pueden utilizarse para crear matrices acelulares dentro del alcance de la presente divulgación. Las matrices de tejido acelular pueden analizarse o evaluarse para determinar si se encuentran sustancialmente libres de células y/o componentes celulares de varias maneras. Por ejemplo, los tejidos procesados pueden inspeccionarse con microscopía de luz para determinar si quedan células (vivas o muertas) y/o componentes celulares. Además, ciertas evaluaciones pueden utilizarse para identificar la presencia de células o componentes celulares. Por ejemplo, el análisis de ADN u otras evaluaciones de ácido nucleico pueden utilizarse para cuantificar los materiales nucleares remanentes dentro de las matrices de tejido. De manera general, la ausencia de ADN remanente u otros ácidos nucleicos será una señal de descclularización completa (es decir, la remoción de células y/o componentes celulares). Finalmente, otras evaluaciones que identifican componentes específicos de las células (por ejemplo, antígenos superficiales) pueden utilizarse para determinar si las matrices de tejido son acelulares.

En general, los pasos involucrados en la producción de una matriz de tejido acelular incluyen la cosecha del tejido de un donante (por ejemplo, un cadáver humano o una fuente animal) y la remoción de células bajo condiciones que conserven la función biológica y estructural. En ciertas realizaciones, el proceso incluye tratamiento químico para estabilizar el tejido y evitar la degradación bioquímica y estructural en conjunto con la remoción celular o antes de llevar a cabo ese proceso. En varias realizaciones, la solución estabilizante detiene y evita la degradación osmótica, hipóxica, autolítica, y proteolítica, ofrece protección contra la contaminación microbiana, y reduce el daño mecánico que puede aparecer cuando los tejidos que contienen, por ejemplo, componentes de músculos suaves (por ejemplo, vasos sanguíneos). La solución estabilizadora puede contener un amortiguador apropiado, uno o más antioxidantes, uno o más agentes oncolíticos, uno o más antibióticos, uno o más inhibidores de proteasa, y/o uno o más relajantes de músculos suaves.

Luego se coloca el tejido en una solución de descclularización para eliminar células viables (por ejemplo, células epiteliales, células endoteliales, células de músculos suaves, y fibroblastos) de la matriz estructural sin dañar la integridad biológica y estructural de la matriz de colágeno. La solución de descclularización puede contener un amortiguador apropiado, sal, un antibiótico, uno o más detergentes (por ejemplo, TRITON X-100™, desoxicolato de sodio, monooleato de polioxietileno (20) sorbitano), uno o más agentes para evitar la reticulación, uno o más inhibidores de proteasa, y/o una o más enzimas. En algunas realizaciones, la solución de descclularización comprende TRITON X-100™ 1% en medios RPMI con Gentamicina y 25 mM EDTA (ácido etilendiaminotetraacético). En algunas realizaciones, el tejido se incubó en la solución de descclularización durante la noche a 37 °C con un batido suave a

90 rpm. En ciertas realizaciones, se pueden utilizar detergentes adicionales para eliminar la grasa de la muestra de tejido. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se agrega desoxicolato de sodio 2% a la solución de descelsularización.

Luego del proceso de descelsularización, la muestra de tejido se lava acabadamente con solución salina. En algunas realizaciones de ejemplo, por ejemplo, cuando se utiliza material xenogénico, el tejido descelsularizado se trata posteriormente durante la noche a temperatura ambiente con una solución desoxirribonucleasa (DNasa). En algunas realizaciones, la muestra de tejido se trata con una solución DNasa preparada en amortiguador DNasa (20 mM HEPES (4-(2-hidroxietil)-1-ácido piperazineetanesulfónico), 20 mM CaCl<sub>2</sub> y 20 mM MgCl<sub>2</sub>). De manera opcional, se puede agregar una solución antibiótica (por ejemplo, Gentamicina) a la solución DNasa. Se puede utilizar cualquier amortiguador apropiado siempre y cuando el amortiguador proporcione una actividad DNasa apropiada.

Mientras que una matriz de tejido acelular se puede producir a partir de uno o más individuos de la misma especie que el receptor del injerto de matriz de tejido acelular, no siempre es así. De esta manera, por ejemplo, se puede producir una matriz de tejido acelular a partir de tejido porcino e implantarse en un paciente humano. Las especies que pueden servir como receptores de matriz de tejido acelular y donantes de tejidos u órganos para la producción de la matriz de tejido acelular incluyen, a mero título enunciativo, mamíferos, como los seres humanos, primates no humanos (por ejemplo, monos, babuinos, o chimpancés), cerdos, vacas, caballos, cabras, ovejas, ratas, o ratones).

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

Dado a que los mamíferos no primates (por ejemplo, cerdos) producen epítomos  $\alpha$ -gal, el xenotrasplante de material que contiene colágeno de estos mamíferos a primates a menudo da como resultado el rechazo debido a las uniones anti-Gal de primates con estos epítomos en el material que contiene colágeno. Los resultados de la unión se dan por la destrucción del material que contiene colágeno debido a la fijación del complemento y la citotoxicidad de células que dependen de anticuerpos. U. Galili et al., Immunology Today 14: 480 (1993); M. Sandrin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 11391 (1993); H. Good et al., Transplant. Proc. 24: 559 (1992); B. H. Collins et al., J. Immunol. 154: 5500 (1995). Además, el xenotrasplante da como resultado una activación principal del sistema inmunológico para producir cantidades en aumento de anticuerpos anti-gal de alta afinidad. Por lo tanto, en algunas realizaciones, cuando los animales que producen epítomos  $\alpha$ -gal se utilizan como la fuente del tejido, la eliminación sustancial de epítomos  $\alpha$ -gal de células y de componentes extracelulares del material que contiene colágeno, y la prevención de la re-expresión de epítomos  $\alpha$ -gal celulares puede disminuir la respuesta inmune contra el material que contiene colágeno relacionado con una unión de anticuerpos anti-gal con epítomos  $\alpha$ -gal.

Para eliminar epítomos  $\alpha$ -gal, luego de lavar el tejido acabadamente con solución salina para eliminar la solución DNasa, la muestra de tejido puede someterse a uno o más tratamientos enzimáticos para eliminar ciertos antígenos inmunogénicos, si se encuentran presentes en la muestra. En algunas realizaciones, la muestra de tejido puede tratarse con una enzima  $\alpha$ -galactosidasa para eliminar los epítomos  $\alpha$ -gal si se encuentran presentes en el tejido. En algunas realizaciones, la muestra de tejido se trata con  $\alpha$ -galactosidasa con una concentración de 300 U/L preparada en 100 mM de amortiguador de fosfato con un pH de 6,0. En otras realizaciones, la concentración de  $\alpha$ -galactosidasa se aumenta a 400 U/L para la remoción adecuada de los epítomos  $\alpha$ -gal del tejido cosechado. Cualquier concentración de enzimas y amortiguador apropiados y se puede utilizar siempre y cuando se logre una remoción de antígenos suficiente.

De forma alternativa, en lugar de tratar el tejido con enzimas, los animales que han sido modificados genéticamente para que no tengan uno o más epítomos antigénicos pueden seleccionarse como la fuente de tejido. Por ejemplo, los animales (por ejemplo, cerdos) que han sido diseñados genéticamente para que no tengan un grupo de  $\alpha$ -galactosa terminal pueden seleccionarse como la fuente de tejido. Para obtener descripciones de animales apropiados, por favor, revise la Solicitud de Patente Co-Pendiente de los Estados Unidos N° 10/896.594 y la Patente de los Estados Unidos N° 6.166.288. Además, se describen ciertos procedimientos de ejemplo para procesar tejidos para producir matrices acelulares con o sin cantidades reducidas o sin grupos  $\alpha$ -1,3-galactosa en Xu, Hui. Et al., "A Porcine-Derived Acellular Dermal Scaffold that Supports Soft Tissue Regeneration: Removal of Terminal Galactose- $\alpha$ (1,3)-Galactose and Retention of Matrix Structure", Tissue Engineering, Vol. 15, 1 – 13 (2009).

Después de formar la matriz de tejido acelular, células viables histocompatibles pueden sembrarse en la matriz de tejido acelular para producir un injerto que puede además moldearse nuevamente por la célula huésped. En algunas realizaciones, las células viables histocompatibles pueden agregarse a las matrices mediante técnicas de co-cultivo de células in vitro estándar antes del trasplante, o mediante la repoblación in vivo luego del trasplante. La repoblación in vivo puede ser mediante las propias células del receptor que migran hacia la matriz de tejido acelular o mediante la infusión o inyección de células obtenidas del receptor o células histocompatibles de otro donante hacia la matriz de tejido acelular in situ. Se pueden utilizar varios tipos de células, inclusive células madre embrionarias, células madre

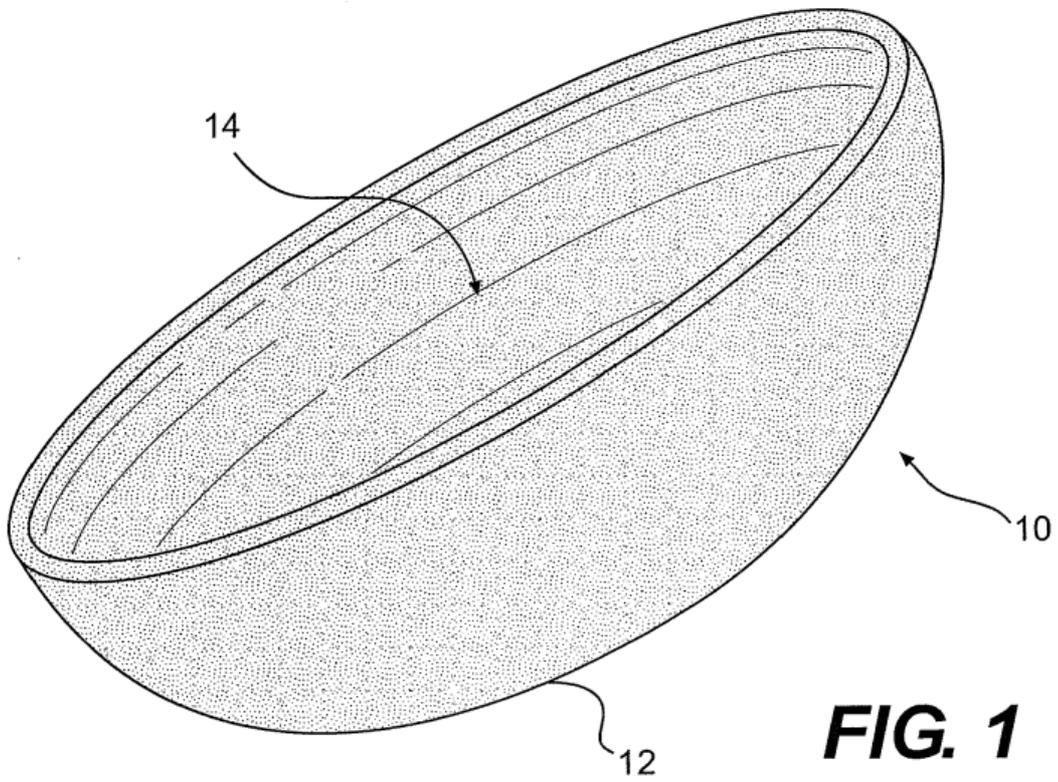
adultas (por ejemplo, células madre mesenquimatosas), y/o células neuronales. En varias realizaciones, las células pueden aplicarse directamente a la parte interna de la matriz de tejido acelular justo antes o después de la implantación. En ciertas realizaciones, las células pueden colocarse dentro de la matriz de tejido acelular a implantar, y cultivarse antes de la implantación.

**REIVINDICACIONES**

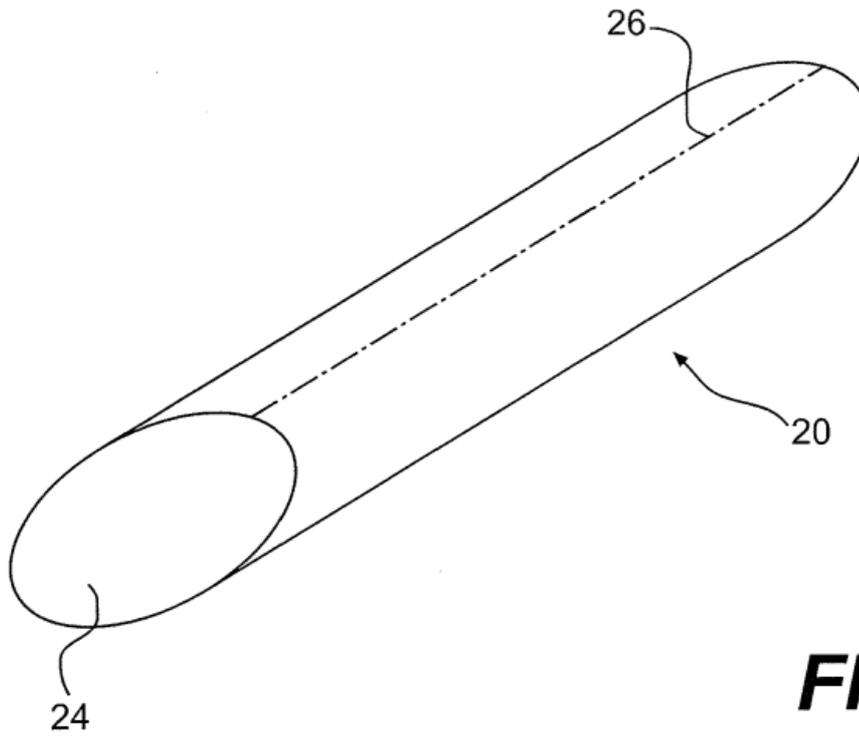
1. Un procedimiento *in vitro* para formar una matriz de tejido que comprende los siguientes pasos:
  - 5                    Seleccionar una matriz de tejido que contenga colágeno;
  - Deshidratar parcialmente la matriz de tejido al eliminar agua para producir una matriz de tejido que contenga entre 95% (en peso) y 50% (en peso) de contenido de agua, de manera tal que la matriz posea una temperatura de desnaturalización, medida mediante calorimetría de barrido diferencial, que se encuentra dentro de 5°C de la temperatura de desnaturalización de la matriz de tejido que contiene colágeno seleccionada;
  - 10                   Aplicar fuerzas mecánicas a la matriz de tejido para cambiar la orientación de al menos algunas fibras de colágeno dentro de la matriz de tejido; y
  - Exponer la matriz de tejido a la radiación.
2. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que la deshidratación parcial de la matriz de tejido produce una matriz que posee una temperatura de desnaturalización, medida con calorimetría de barrido diferencial, que se encuentra dentro de 3°C de la temperatura de desnaturalización de la matriz de tejido que contiene colágeno seleccionada.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2 en el que la deshidratación parcial de la matriz de tejido incluye la eliminación de agua para producir una matriz de tejido que contiene entre 80% (en peso) y 65% (en peso).
4. El procedimiento de la reivindicación 1, 2, o 3, que además comprende la rehidratación de la matriz de tejido.
5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 – 4, en el que la radiación se aplica en una dosis de entre 5 Gy y 50 kGy.
6. El procedimiento de la reivindicación 5 en el que la radiación se aplica en una dosis de entre 5 Gy y 20 kGy.
7. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la radiación se aplica en una dosis de menos de 10 kGy.
8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que la radiación se aplica en una dosis menor a 5 kGy.
9. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que la radiación se aplica en una dosis menor a 1 kGy.
10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 – 9, en el que la radiación se selecciona de un grupo que consiste en las siguientes: radiación gamma, radiación e-Beam, y radiación de rayos X.
11. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 – 10, en el que la matriz de tejido posee una permeabilidad a fluidos que es menor que la permeabilidad de la matriz de tejido antes de la deshidratación, aplicación de fuerzas mecánicas, y radiación.
12. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 – 11, en el que la exposición de la matriz de tejido a la radiación estabiliza la estructura tridimensional.
13. Un producto de tejido formable mediante un proceso que consiste en los pasos mencionados en cualquiera de las reivindicaciones 1- 12, cuyo producto comprende los siguientes elementos: una matriz de tejido extracelular que comprende colágeno, en la que la matriz de tejido extracelular posee una forma tridimensional, en la que la forma tridimensional es una forma similar a la de una taza, o es una forma tubular.
14. El producto de la reivindicación 13, en el que la matriz de tejido es una matriz de tejido acelular, y/o en el que la matriz de tejido comprende una matriz de tejido dérmica.
15. El producto de la reivindicación 13, en el que el tejido se selecciona del siguiente grupo: la fascia, el tejido de tejido del pericardio, la duramadre, el tejido del cordón umbilical, tejido de placenta, tejido válvula cardíaca, tejido ligamento, tejido de tendón, tejido de arteria, tejido venoso, tejido conectivo neural, tejido de la vejiga, tejido del uréter, y tejido intestinal.
16. Un producto de tejido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15 que comprende:
  - Una matriz de tejido extracelular que comprende fibras de colágeno,

en el que al menos algunas fibras de colágeno dentro de la matriz poseen una orientación que es diferente a la orientación de las fibras en un tejido del que está producida la matriz y la matriz tiene una forma tridimensional estable,

- 5 y en la que la matriz posee una temperatura de desnaturalización medida con calorimetría de barrido diferencial que se encuentra dentro de 5°C de la temperatura de desnaturalización del tejido del que está producida la matriz.
17. El producto de la reivindicación 16, en el que la matriz posee una temperatura de desnaturalización medida con calorimetría de barrido diferencial que se encuentra dentro de 3°C de la temperatura de desnaturalización del tejido del que está producida la matriz.
- 10 18. Un producto de tejido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15 que comprende:  
Una matriz de tejido extracelular que comprende fibras de colágeno, en la que al menos algunas fibras de colágeno dentro de la matriz tienen una orientación que es diferente a la orientación de las fibras en un tejido del que está producida la matriz, y en el que la matriz tiene una forma tridimensional estable sin la utilización de agentes químicos de reticulación.
- 15 19. El producto de la reivindicación 18, en el que la matriz de tejido extracelular produce una forma tridimensional estable que es diferente a la forma tridimensional de un tejido del que está producida la matriz de tejido.



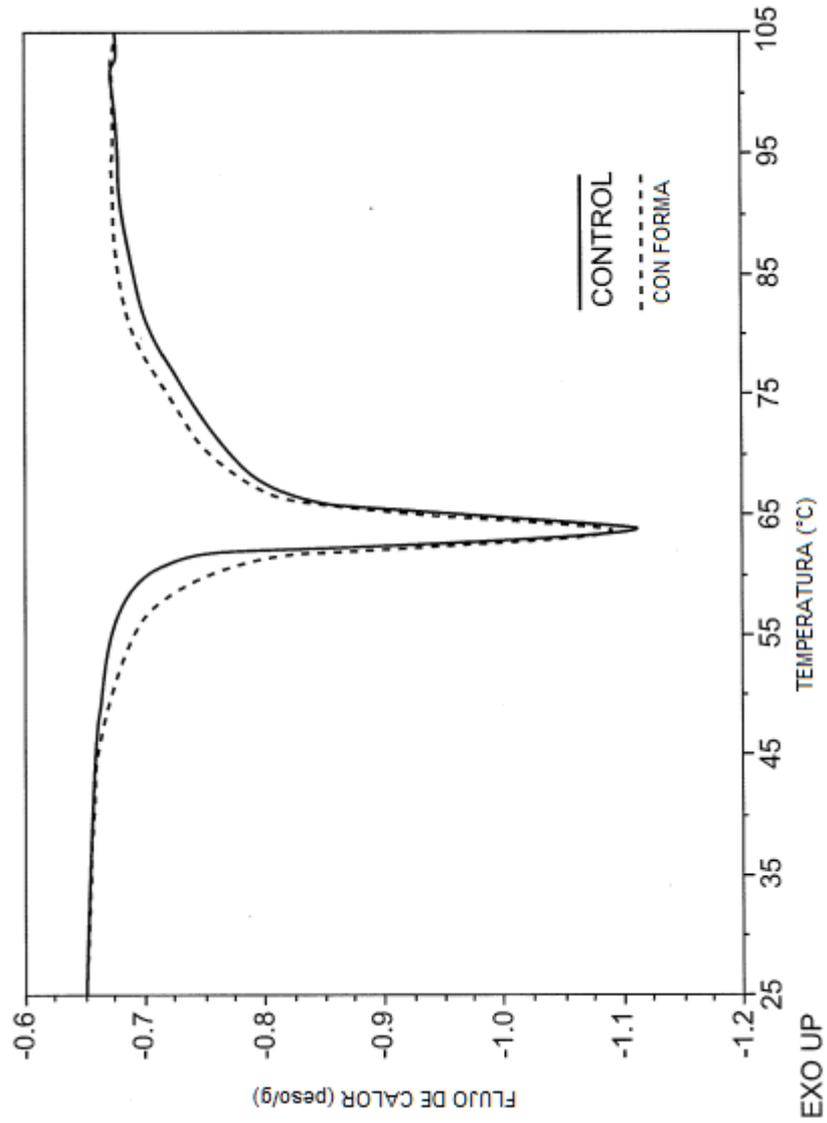
**FIG. 1**



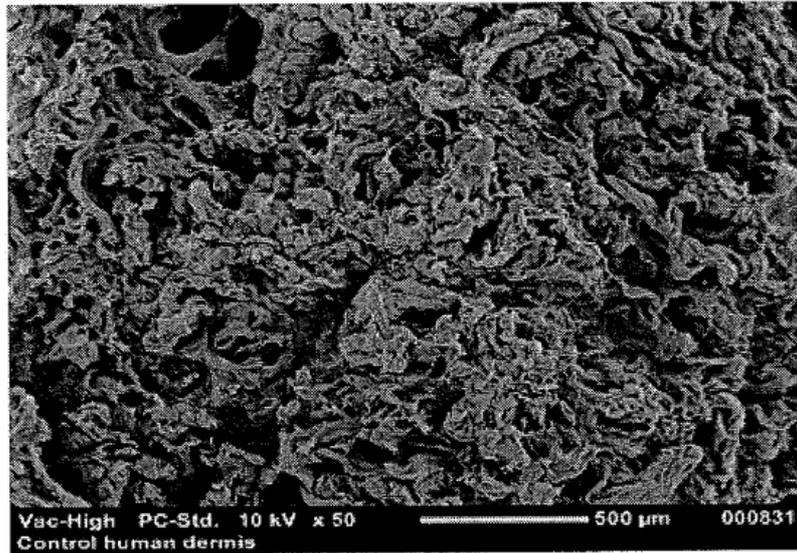
**FIG. 2**



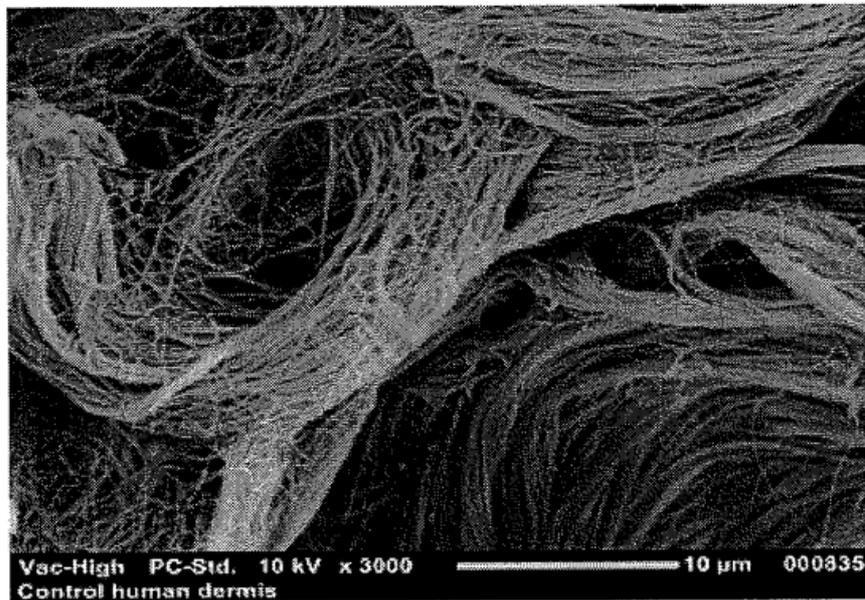
**FIG. 3**



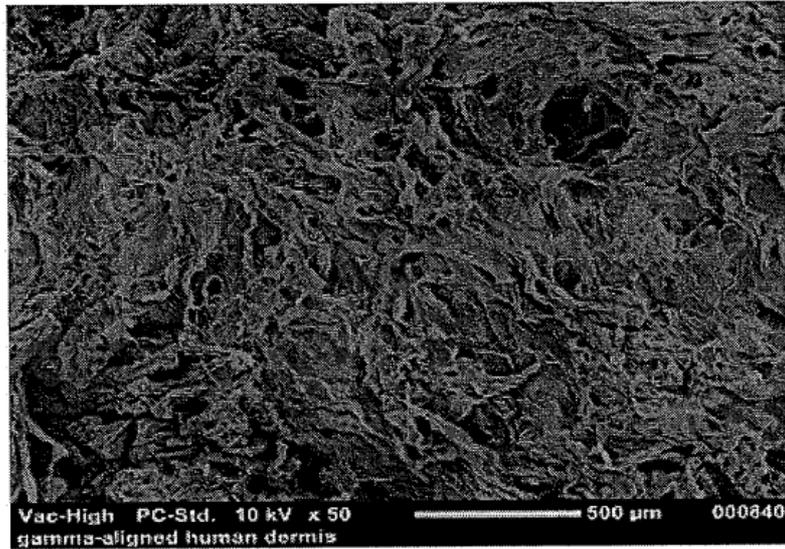
**FIG. 4**



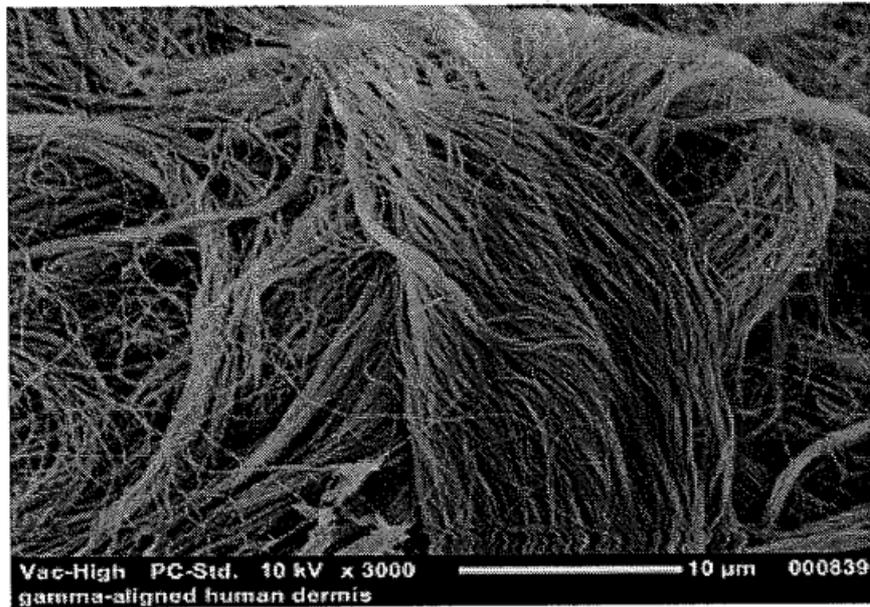
**FIG. 5A**



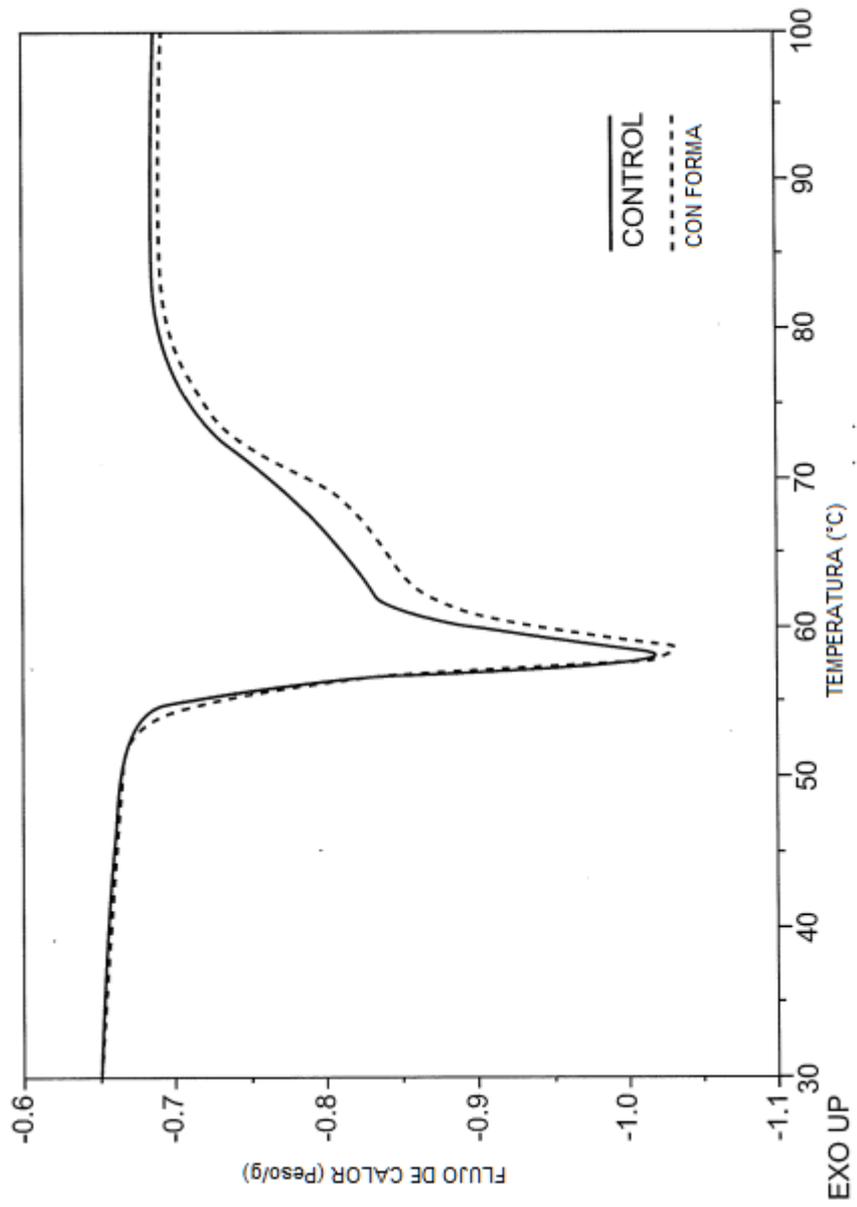
**FIG. 5B**



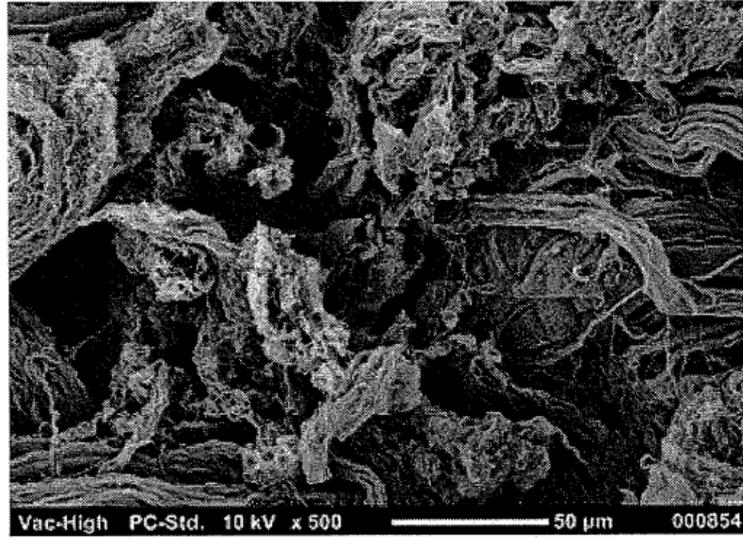
**FIG. 5C**



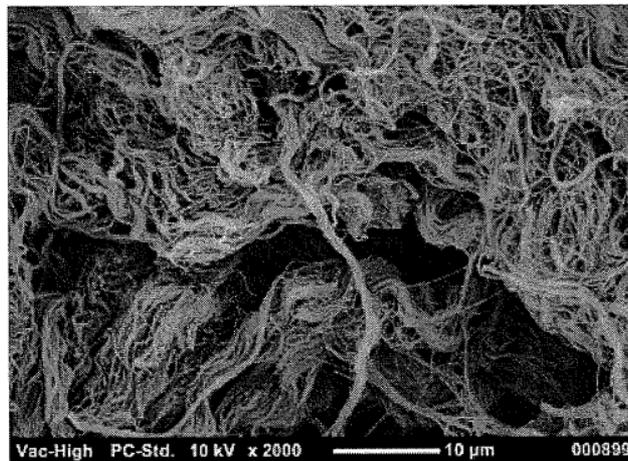
**FIG. 5D**



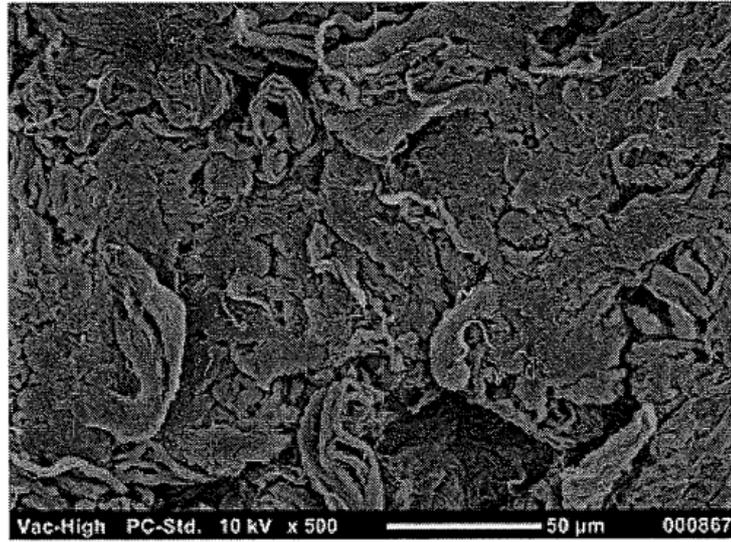
**FIG. 6**



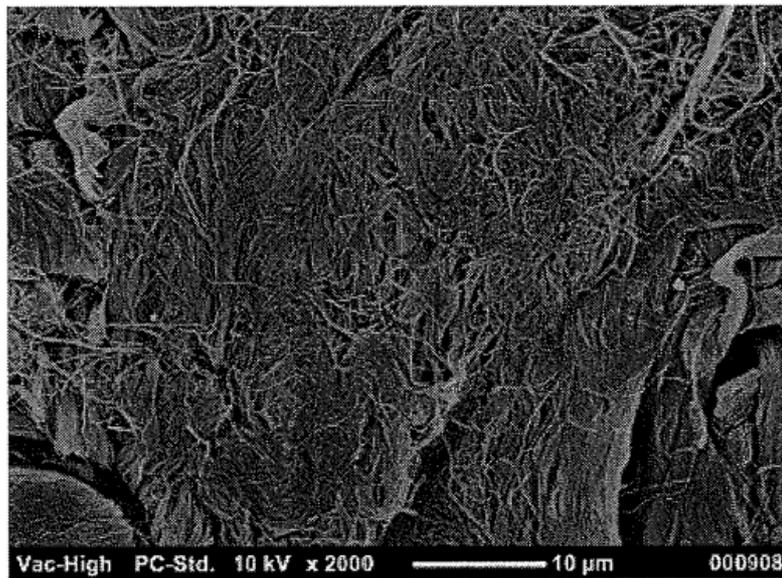
**FIG. 7A**



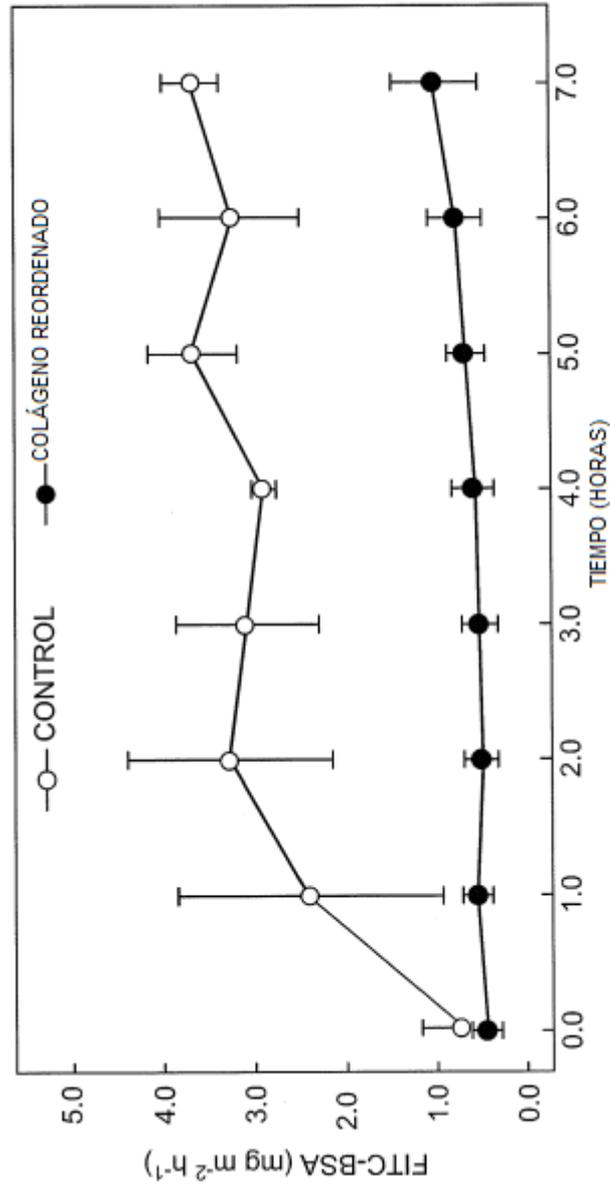
**FIG. 7B**



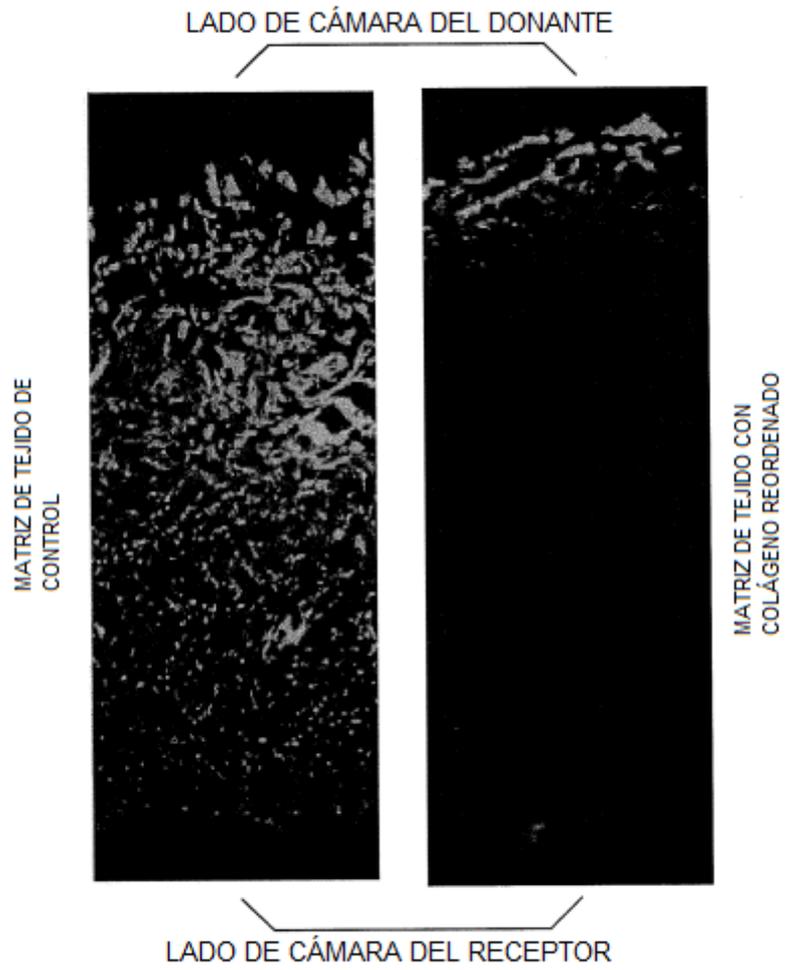
***FIG. 7C***



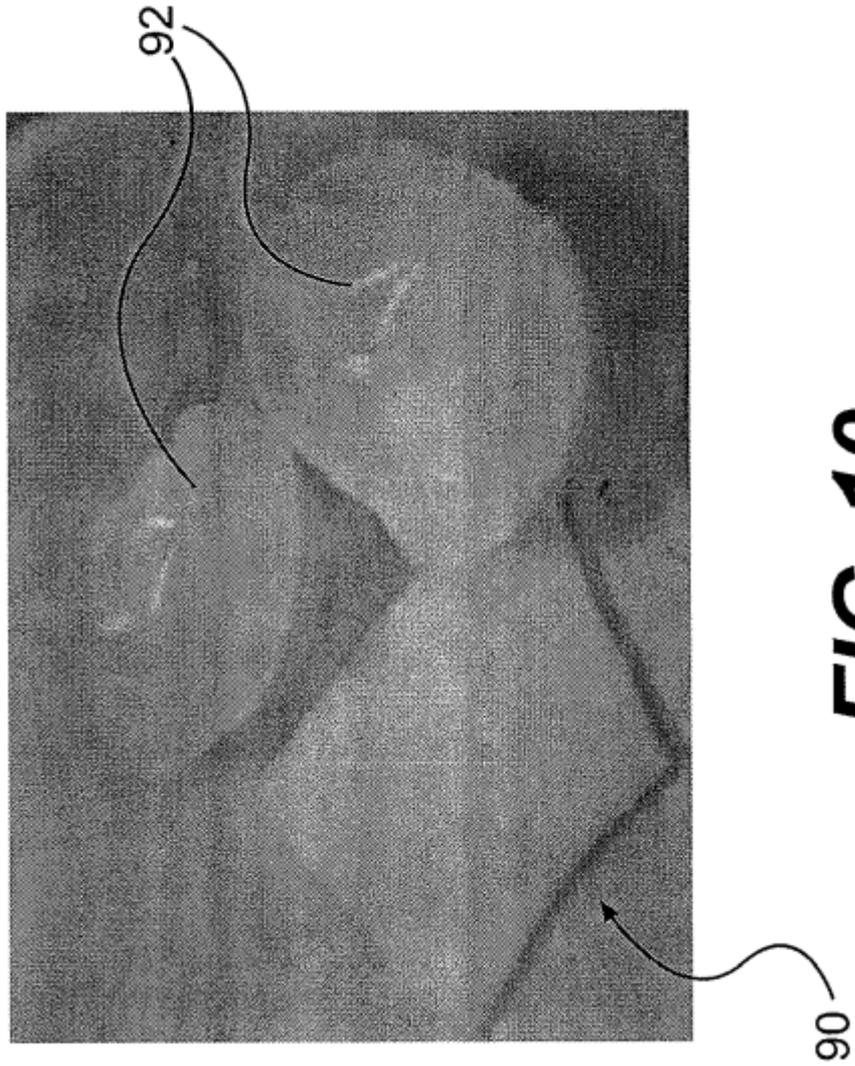
***FIG. 7D***



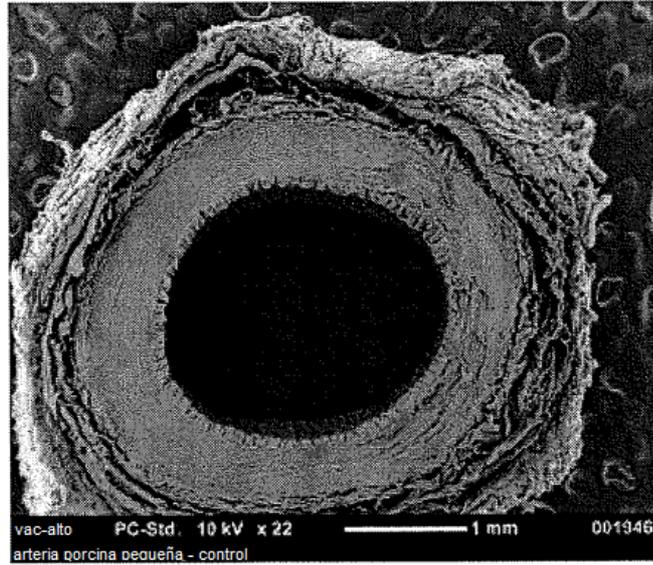
**FIG. 8**



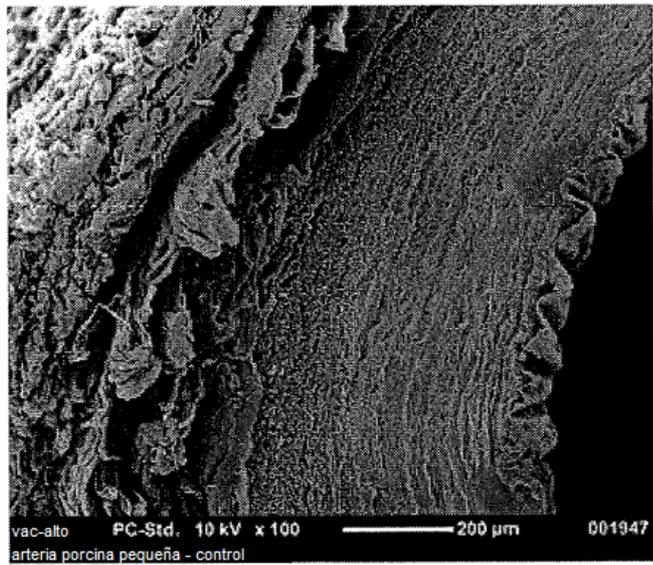
**FIG. 9**



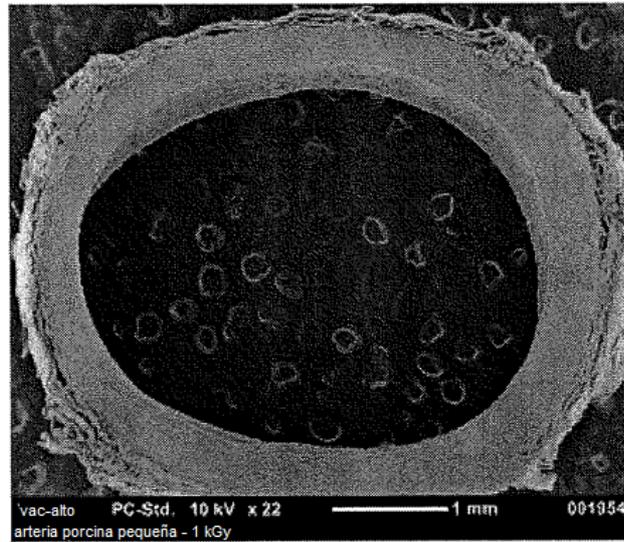
**FIG. 10**



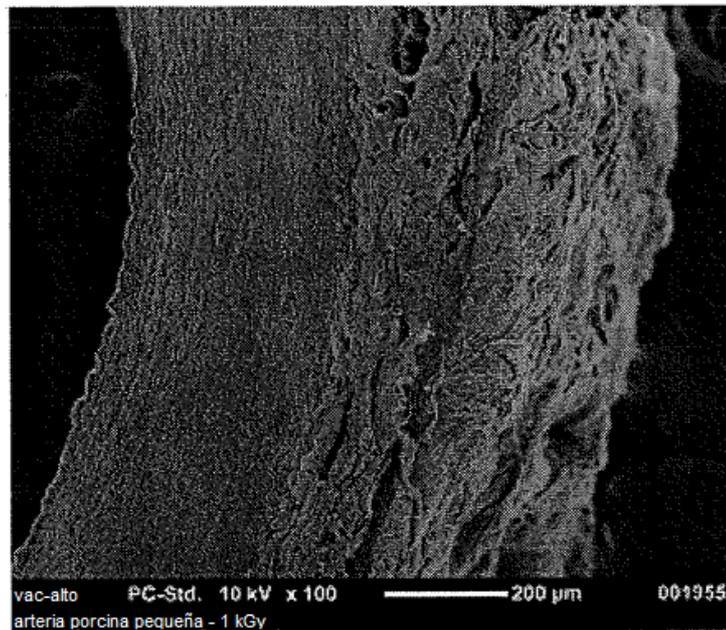
**FIG. 11A**



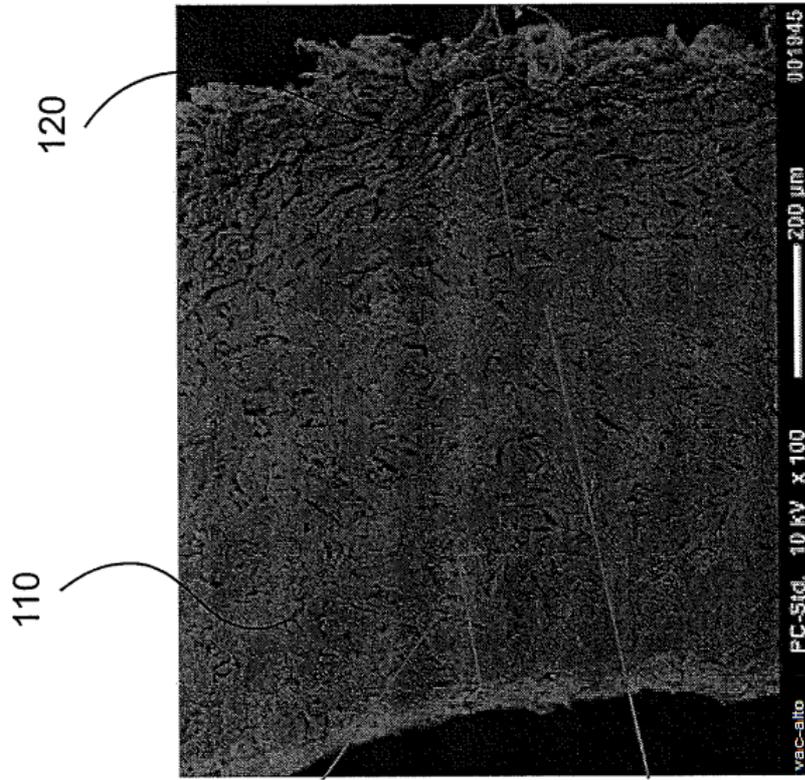
**FIG. 11B**



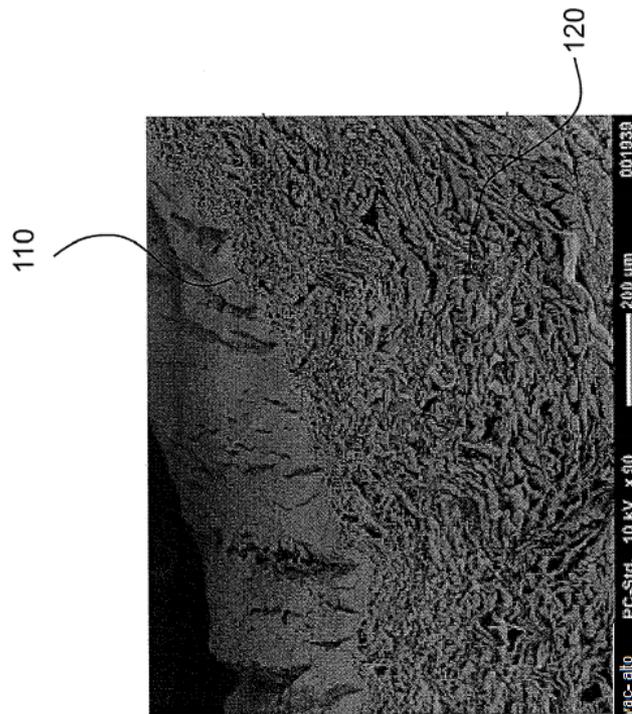
**FIG. 11C**



**FIG. 11D**



**FIG. 12B**



**FIG. 12A**