

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 781 578**

51 Int. Cl.:

**A61L 27/36** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.01.2014 PCT/US2014/012854**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.08.2014 WO14123703**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.01.2014 E 14703722 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2020 EP 2953658**

54 Título: **Métodos para la modificación localizada de productos tisulares**

30 Prioridad:

**06.02.2013 US 201361761298 P**

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

**03.09.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MONTEIRO, GARY;  
WAGNER, CHRISTOPHER, T.;  
RODRIGUEZ, NEIL, L. y  
DELOSSANTOS, AUBREY, IRENE**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 781 578 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

Métodos para la modificación localizada de productos tisulares

5 La presente descripción se refiere a matrices de tejidos, y más particularmente, a métodos para la modificación localizada de propiedades mecánicas y/o biológicas de matrices de tejidos.

Se utilizan diversos productos derivados de tejidos para regenerar, reparar o tratar tejidos y órganos enfermos o dañados. Dichos productos pueden incluir injertos de tejido intactos y/o tejidos acelulares o acelulares reconstituidos (por ejemplo, matrices de tejido acelular de piel, intestino u otros tejidos, con o sin siembra celular). Dichos productos generalmente tienen propiedades mecánicas determinadas por la fuente de tejido (es decir, el tipo de tejido y el animal del que se originó) y los parámetros de procesamiento utilizados para producir los productos tisulares. Dado que los productos tisulares a menudo se usan para aplicaciones quirúrgicas y/o reemplazo o aumento de tejido, las propiedades mecánicas y biológicas de los productos tisulares son importantes. Por ejemplo, los productos tisulares deben ser capaces de proporcionar un soporte mecánico adecuado (por ejemplo, para cerrar un defecto del tejido), al tiempo que permiten el crecimiento y la regeneración del tejido. En algunos casos, sin embargo, puede ser deseable modificar las propiedades mecánicas y/o biológicas de los productos tisulares. Además, para mejorar el rendimiento de los productos tisulares para aplicaciones específicas, puede ser deseable producir productos tisulares que tengan propiedades mecánicas y/o biológicas variables. Por consiguiente, la presente descripción proporciona dispositivos y métodos para la modificación localizada de propiedades mecánicas y/o biológicas de productos tisulares, incluidas las matrices de tejido acelular. El documento WO 2013/016571 describe el control de un proceso de reticulación de colágeno para crear productos reticulados con tasas de degradación personalizables para fines médicos.

Resumen

25 De acuerdo con diversas modalidades, se proporciona un método para tratar una matriz de tejido. El método comprende seleccionar una matriz de tejido que contiene colágeno, que proporciona una superficie sólida que tiene uno o más canales configurados para permitir que el fluido fluya a través de esta, poniendo en contacto la matriz de tejido con la superficie y haciendo que un fluido que contiene un agente de reticulación fluya a través de los canales para reticular las porciones seleccionadas de la matriz de tejido para producir una matriz de tejido que tiene propiedades mecánicas o biológicas que varían a través de la matriz de tejido. En algunas modalidades, la matriz de tejido es una matriz de tejido acelular. En ciertas modalidades, la matriz de tejido comprende una matriz de tejido dérmico. En otras modalidades, la matriz de tejido se deriva de un tejido seleccionado de fascia, tejido pericárdico, duramadre, tejido de cordón umbilical, tejido placentario, tejido de válvula cardíaca, tejido de ligamento, tejido de tendón, tejido arterial, tejido venoso, tejido conectivo neural, tejido de vejiga urinaria, tejido del uréter y tejido intestinal.

En algunas modalidades, el método incluye además tratar la matriz de tejido para eliminar al menos algunas de las células y componentes celulares de la matriz de tejido. En algunas modalidades, el método incluye eliminar todas las células y componentes celulares de la matriz de tejido.

40 En diversas modalidades, se proporcionan productos tisulares producidos de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos.

En ciertas modalidades, se proporciona un producto tisular. El producto tisular puede comprender una matriz de tejido acelular derivada de un tejido que contiene colágeno, en donde la matriz de tejido comprende una lámina flexible, y en donde la matriz de tejido comprende regiones seleccionadas de material reticulado, las regiones seleccionadas de la matriz de tejido han sido reticuladas proporcionando una superficie sólida que tiene uno o más canales configurados para permitir que el fluido fluya a través de estos, poniendo en contacto la matriz de tejido con la superficie, y haciendo que el fluido que contiene un agente de reticulación fluya a través de los canales, y en donde las propiedades mecánicas o biológicas de la matriz de tejido varían a través de la lámina flexible.

Descripción de los dibujos

55 Las Figuras 1A-1B ilustran un dispositivo para la modificación microfluídica de un producto tisular, de acuerdo con ciertas modalidades.

La Figura 2 ilustra un dispositivo para la modificación microfluídica de un producto tisular, de acuerdo con ciertas modalidades.

La Figura 3 ilustra una matriz de tejido acelular que ha sido tratada para proporcionar modificación localizada de propiedades mecánicas y/o biológicas, de acuerdo con ciertas modalidades.

60 La Figura 4 ilustra una matriz de tejido acelular que ha sido tratada para proporcionar modificación localizada de propiedades mecánicas y/o propiedades biológicas, de acuerdo con ciertas modalidades.

La Figura 5 ilustra una matriz de tejido acelular que ha sido tratada para proporcionar modificación localizada de propiedades mecánicas y/o propiedades biológicas, de acuerdo con ciertas modalidades.

65 La Figura 6 ilustra una matriz de tejido acelular que ha sido tratada para proporcionar modificación localizada de propiedades mecánicas y/o propiedades biológicas, de acuerdo con ciertas modalidades.

La Figura 7 ilustra una matriz de tejido acelular que ha sido tratada para proporcionar una modificación localizada de

propiedades mecánicas y/o propiedades biológicas, de acuerdo con ciertas modalidades.

La Figura 8 ilustra una matriz de tejido acelular que ha sido tratada para proporcionar modificación localizada de propiedades mecánicas y/o propiedades biológicas, de acuerdo con ciertas modalidades.

5 La Figura 9 ilustra una matriz de tejido acelular que ha sido tratada para proporcionar modificación localizada de propiedades mecánicas y/o propiedades biológicas, de acuerdo con ciertas modalidades.

La Figura 10 ilustra una matriz de tejido acelular que ha sido tratada para proporcionar una modificación localizada de propiedades mecánicas y/o propiedades biológicas, de acuerdo con ciertas modalidades.

La Figura 11 ilustra una matriz de tejido acelular que ha sido tratada para proporcionar modificación localizada de propiedades mecánicas y/o propiedades biológicas, de acuerdo con ciertas modalidades.

10

Descripción de ciertas modalidades ilustrativas

Ahora se hará referencia en detalle a ciertas modalidades ilustrativas de acuerdo con la presente divulgación, cuyos ejemplos se ilustran en los dibujos adjuntos. Siempre que sea posible, se utilizarán los mismos números de referencia en todos los dibujos para hacer referencia a las mismas partes o a partes similares.

15

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

20

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

25

Como se usa en el presente documento, "producto tisular" se referirá a cualquier tejido humano o animal que contenga proteínas de matriz extracelular. Los "productos tisulares" pueden incluir matrices tisulares acelulares o parcialmente descelularizadas, así como matrices tisulares descelularizadas que se han repoblado con células exógenas.

30

Se pueden utilizar diversos tejidos humanos y animales para producir productos para el tratamiento de pacientes. Por ejemplo, varios productos tisulares están disponibles para la regeneración, reparación, aumento, refuerzo y/o tratamiento de tejidos humanos que se han dañado o perdido debido a diversas enfermedades y/o daños estructurales (por ejemplo, por traumatismo, cirugía, atrofia y/o desgaste y degeneración a largo plazo). Dichos productos pueden incluir, por ejemplo, matrices de tejido acelular, aloinjertos de tejido o xenoinjertos, y/o tejidos reconstituidos (es decir, tejidos al menos parcialmente descelularizados que se han cultivado con células para producir materiales viables).

35

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

40

Sin embargo, algunos productos tisulares pueden mejorarse funcionalmente alterando las propiedades mecánicas de los productos. Por ejemplo, hay varios productos de matriz de tejido acelular disponibles y, a menudo, tales matrices de tejido tienen la forma de una lámina flexible de material que tiene propiedades mecánicas y/o biológicas sustancialmente uniformes en toda su área superficial. Sin embargo, para algunas indicaciones, puede ser deseable alterar las propiedades mecánicas y/o biológicas de tales matrices de tejidos de modo que las propiedades varíen a través del material. Por ejemplo, en algunas modalidades, puede ser deseable fortalecer, endurecer, debilitar o hacer más flexibles las regiones de selección de un producto tisular para producir un producto que tenga propiedades mecánicas variables. Además, en algunas modalidades, puede ser deseable modificar ciertas propiedades elásticas o viscoelásticas de una matriz de tejido, que incluye, por ejemplo, la resistencia al estiramiento a bajos niveles de deformación (por ejemplo, mecánica de la región del dedo del pie).

50

Puede ser deseable tratar regiones seleccionadas de los productos tisulares para controlar la velocidad de degradación, crecimiento celular y/o vascularización después de la implantación. Se conoce que la reticulación puede aumentar la resistencia de las matrices de tejidos a la degradación por células inflamatorias dentro del cuerpo, y tal resistencia aumentada puede disminuir la velocidad de debilitamiento después de la implantación. Por consiguiente, en algunas modalidades, puede ser deseable proporcionar reticulación localizada para proporcionar áreas de la matriz de tejido que mantengan su capacidad de proporcionar soporte mecánico a un sitio de implantación durante más tiempo después de la implantación, mientras que simultáneamente proporcionan suficiente masa de matriz de tejido para soportar la regeneración tisular normal dentro de porciones no reticuladas de la matriz tisular.

60

La presente descripción proporciona métodos para tratar tejidos para proporcionar propiedades mecánicas y/o biológicas variables a lo largo de la longitud, ancho, o grosor de una matriz de tejido de acuerdo con las reivindicaciones. La divulgación también proporciona productos tisulares producidos usando los métodos de tratamientos de acuerdo con las

65

reivindicaciones.

De acuerdo con diversas modalidades, se proporciona un método para tratar una matriz de tejido. El método puede comprender seleccionar una matriz de tejido que contenga colágeno, proporcionar una superficie sólida que tenga uno o más canales configurados para permitir que el fluido fluya a través de estos, poniendo en contacto la matriz de tejido con la superficie, y haciendo que fluya un fluido que contiene un agente de reticulación a través de los canales para reticular porciones de la matriz de tejido seleccionadas para producir una matriz de tejido que tiene propiedades mecánicas y/o biológicas que varían a través de la matriz de tejido. En algunas modalidades, la matriz de tejido es una matriz de tejido acelular. En ciertas modalidades, la matriz de tejido comprende una matriz de tejido dérmico.

Los productos tisulares de acuerdo con la presente descripción pueden seleccionarse para proporcionar una variedad de propiedades biológicas y/o mecánicas diferentes. Por ejemplo, se puede seleccionar una matriz de tejido acelular u otro producto tisular para permitir el crecimiento y la remodelación del tejido para ayudar en la regeneración del tejido que normalmente se encuentra en el sitio donde se implanta la matriz. Por ejemplo, una matriz de tejido acelular, cuando se implanta sobre o dentro de la fascia u otro tejido blando, puede seleccionarse para permitir la regeneración de la fascia u otro tejido blando sin fibrosis excesiva o formación de cicatrices. En ciertas modalidades, el producto tisular puede formarse a partir de ALLODERM® o STRATTICE™ (LIFE-CELL CORPORATION, Branchburg, NJ), que son matrices dérmicas acelulares humanas y porcinas, respectivamente. Alternativamente, se pueden usar otras matrices de tejido acelular adecuadas, como se describe más adelante. Los tejidos pueden seleccionarse de una variedad de fuentes de tejido que incluyen piel (dermis o piel completa), fascia, tejido pericárdico, duramadre, tejido de cordón umbilical, tejido placentario, tejido de válvula cardíaca, tejido de ligamento, tejido de tendón, tejido arterial, tejido venoso, tejido conectivo neural, tejido de vejiga urinaria, tejido del uréter y tejido intestinal. Los métodos descritos en este documento pueden usarse para procesar cualquier tipo de tejido colágeno y para cualquier producto de matriz de tejido. Por ejemplo, Badylak y otros describen una serie de materiales de armazón biológicos, y los métodos de la presente descripción pueden usarse para tratar esos u otros productos tisulares conocidos en la técnica. Badylak y otros, "Extracellular Matrix as a Biological Scaffold Material: Structure and Function", Acta Biomaterialia (2008), doi:10.1016/j.act-bio.2008.09.013.

En algunos casos, la matriz de tejido puede proporcionarse como una matriz de tejido descelularizada. Las matrices de tejido acelular adecuadas se describen más adelante. En otros casos, el método puede incluir además procesar tejido intacto para eliminar células u otros materiales antes, después o antes y después de la reticulación o el tratamiento proteolítico de acuerdo con la presente solicitud. Los tejidos pueden descelularizarse total o parcialmente para producir matrices de tejido acelular o materiales de tejido extracelular para ser utilizados por los pacientes. Por ejemplo, varios tejidos, tales como piel, intestino, hueso, cartilago, tejido nervioso (por ejemplo, fibras nerviosas o duramadre), tendones, ligamentos u otros tejidos pueden descelularizarse total o parcialmente para producir productos tisulares útiles para los pacientes. En algunos casos, estos productos descelularizados pueden usarse sin la adición de materiales celulares exógenos (por ejemplo, células madre). En ciertos casos, estos productos descelularizados pueden cultivarse con células de fuentes autólogas u otras fuentes para facilitar el tratamiento. Los procesos adecuados para producir matrices de tejido acelular se describen a continuación.

En ciertas modalidades, las matrices de tejidos pueden tratarse para proporcionar una variación localizada en las propiedades mecánicas y/o biológicas poniendo en contacto las matrices de tejidos con uno o más agentes de reticulación, y opcionalmente enzimas proteolíticas. En general, las matrices se pueden tratar poniendo en contacto porciones seleccionadas de las matrices de tejido con un fluido que contiene el agente y, opcionalmente, una enzima y en condiciones (por ejemplo, temperatura y/o pH) y durante un tiempo suficiente para producir un grado de reticulación deseado, y opcionalmente proteólisis.

El fluido que contiene enzimas o agentes de reticulación se puede aplicar a regiones seleccionadas de la matriz de tejido de varias maneras. En ciertas modalidades, el fluido se hace fluir en contacto con la matriz de tejido para permitir el contacto con solo aquellas regiones de la matriz de tejido que se seleccionan para la modificación. Las Figuras 1A-1B ilustran un dispositivo 10 para la modificación microfluídica de productos tisulares, de acuerdo con ciertas modalidades. Como se muestra en la Figura 1A, el dispositivo 10 puede incluir un cuerpo rígido con una superficie inferior 12 y una superficie superior 14, así como una serie de canales 16. Cuando está en uso, el dispositivo 10 puede colocarse con la superficie inferior 12 y los canales 16 orientados hacia abajo hacia una superficie rígida 15 (Figura 1B). Se puede colocar una matriz de tejido 19 entre la superficie inferior 12 y la superficie rígida 15 con presión suficiente para evitar sustancialmente el flujo de fluido a través de la matriz de tejido 19 que no sea en las regiones rodeadas por los canales 16. Se puede hacer que el fluido que contiene agentes de reticulación o enzimas fluya a través de los canales 16 a través de los tubos de suministro de fluido de entrada y salida 18, 20. En algunas modalidades, cada canal 16 puede conectarse a un tubo de suministro individual 18, 20, o uno o más de los canales pueden conectarse al tubo de suministro a través de colectores, siempre que se logre un grado deseado de flujo de fluido.

Los canales 16 pueden tener una variedad de formas, tamaños y configuraciones. En general, los canales 16 deben estar lo suficientemente separados como para permitir que se forme un sello entre los canales cuando se ponen en contacto con una matriz de tejido. Además, los anchos adecuados de los canales pueden variar de 1 micrón a 5 cm, y las alturas adecuadas de los canales pueden variar de 1 micrón a 2 mm. Además, los bordes del canal deben estar redondeados o romos para evitar daños en el tejido.

Se pueden usar varios agentes de reticulación diferentes, y opcionalmente enzimas para tratar las matrices de tejidos. Por ejemplo, los agentes de reticulación adecuados pueden incluir glutaraldehído, EDC, genepin, aldehídos y/o lisil oxidasa; y enzimas adecuadas pueden incluir sulfhidrilo proteasas tales como bromelina. Además, las enzimas pueden incluir bromelina, papaína, ficina, actinidina o combinaciones de las mismas. Las enzimas y los agentes de reticulación se pueden adquirir comercialmente; o se pueden extraer enzimas de fuentes de fruta. Por ejemplo, una fuente de bromelina es MCCORMICK MEAT TENDERIZER, pero las enzimas también se pueden extraer de la piña y/o comprar en una formulación de grado médico.

Las enzimas pueden ponerse en contacto con los tejidos para aumentar la flexibilidad del tejido sin provocar una degradación indeseable en otras propiedades mecánicas y/o biológicas. Por ejemplo, cuando se produce un lote de materiales con o sin los tratamientos enzimáticos analizados en la presente, los tratamientos enzimáticos no producirán un cambio indeseable en al menos uno de la resistencia a la tracción, la resistencia al desgarre, la resistencia a la sutura, la resistencia a la fluencia, la susceptibilidad a la colagenasa, el contenido de glucosaminoglicanos, el contenido de lectina, la resistencia al reventamiento, la temperatura de transición térmica, o combinaciones de los mismos. En algunos casos, un cambio no deseado es una reducción estadísticamente significativa de la resistencia a la tracción, la resistencia al desgarre, la resistencia a la sutura, la resistencia a la fluencia, el contenido de glicosaminoglicanos, el contenido de lectina, la resistencia al reventamiento; un aumento en la susceptibilidad a la colagenasa; o un cambio (hacia arriba o hacia abajo) en la temperatura de transición térmica (como medida usando calorimetría diferencial de barrido).

En algunos casos, las enzimas se seleccionan de modo que provocan la escisión sitio específica de las proteínas dentro de los tejidos. Por ejemplo, se ha encontrado que el tratamiento de materiales dérmicos de porcinos con bromelina no provoca alteraciones adicionales en la estructura de la matriz después de una cierta cantidad de tratamiento. Por lo tanto, el tratamiento de la dermis con bromelina no provoca más cambios en la matriz con la exposición prolongada o después de períodos de tiempo prolongados.

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

El dispositivo 10 usado para entrar en contacto con la matriz de tejido 19 con enzimas y/o agentes de reticulación puede tener una variedad de configuraciones diferentes. Por ejemplo, como se describe con más detalle a continuación con respecto a las Figuras 3-10, la matriz de tejido 19 puede tratarse mediante reticulación, y opcionalmente mediante el tratamiento con enzimas proteolíticas, en una serie de ubicaciones adecuadas para producir un patrón que proporciona variaciones deseadas en las propiedades mecánicas y/o biológicas. La Figura 2 ilustra un dispositivo 10' para la modificación microfluidica de productos tisulares, de acuerdo con ciertas modalidades. Como se muestra, el dispositivo 10' incluye nuevamente una estructura rígida con canales 16'. Sin embargo, en la modalidad de la Figura 2, los canales 16' tienen una forma o patrón que es diferente al de la Figura 1, permitiendo así el contacto del agente de reticulación, y opcionalmente la enzima proteolítica, para producir una matriz de tejido modificada con una configuración diferente. Además, el dispositivo 10' tiene dos aberturas 18' y 20', que proporcionan pasajes para el flujo de fluido dentro y fuera de los canales 16', en lugar de tener múltiples aberturas separadas 18, 20, como con el dispositivo de la Figura 1. Se puede usar cualquier número adecuado de aberturas para proporcionar un flujo adecuado de fluido a través de los canales 16, 16'.

Los métodos de la presente divulgación se pueden usar para modificar las propiedades mecánicas y/o biológicas en varias ubicaciones diferentes. Las Figuras 3-10 ilustran matrices de tejido acelular que han sido tratadas para proporcionar una modificación localizada de las propiedades mecánicas y/o biológicas, de acuerdo con ciertas modalidades. En diversas modalidades, las matrices de tejido se pueden tratar para modificar las regiones seleccionadas de una matriz de tejido en forma de lámina sobre regiones que tienen un patrón de serpentina 32 (Figura 3), un patrón en espiral 42 (Figura 4), patrones lineales 52, 62 (Figuras 5 y 6), patrones curvos 72 (Figura 7), a lo largo de patrones lineales o alineados longitudinalmente 82 en una lámina envuelta cilíndricamente 80 (Figura 8), en un patrón circular 92 (Figura 9), en patrón de tipo red 102 (Figura 10), o en un patrón de cuadrícula 110 (Figura 11).

El patrón específico de la región seleccionada para la reticulación localizada o el tratamiento proteolítico se puede seleccionar por una variedad de razones. Se conoce que la reticulación puede aumentar la resistencia de las matrices de tejidos a la degradación por las células inflamatorias dentro del cuerpo, y tal resistencia aumentada puede disminuir la velocidad del debilitamiento después de la implantación. Sin embargo, la reticulación excesiva puede tener efectos adversos sobre la infiltración celular y la regeneración de tejido normal dentro de la matriz de tejido. Por consiguiente, en algunas modalidades, puede ser deseable proporcionar reticulación localizada para proporcionar áreas de la matriz de tejido que mantengan su capacidad de proporcionar soporte mecánico a un sitio de implantación durante más tiempo después de la implantación, mientras que simultáneamente proporcionan suficiente masa de matriz de tejido para soportar la regeneración tisular normal dentro de porciones no reticuladas de la matriz tisular.

El tratamiento de proteasa localizado puede usarse por una variedad de razones. Por ejemplo, el tratamiento de proteasa localizado puede permitir la producción de diferentes resistencias u otras propiedades mecánicas que tratan el tejido para hacer que el nativo sea más fuerte. Además, la producción de matrices de tejido con flexibilidad localizada puede permitir que un cirujano coloque tejido en pequeñas aberturas, incluyendo el paso de una matriz de tejido a través de una incisión

laparoscópica o un trocar. Además, la producción de tejido con flexibilidad localizada puede ser beneficiosa para permitir la correspondencia de la elasticidad con los tejidos naturales o para igualar las propiedades mecánicas anisotrópicas de los tejidos.

5 El patrón específico de tratamiento localizado puede seleccionarse en función de un sitio de implantación o método de tratamiento deseado. Por ejemplo, en diversas modalidades, el patrón puede seleccionarse para proporcionar una matriz de tejido tratada que tenga propiedades mecánicas mejoradas (por ejemplo, mayor resistencia a la fluencia) a lo largo de dimensiones que pueden ser más propensas a experimentar mayores cargas durante el uso. Por ejemplo, en las modalidades de las Figuras 3-6 y 9-10, el patrón puede seleccionarse para aumentar la resistencia de la lámina de matriz de tejido a lo largo de uno o más ejes paralelos a la lámina de matriz de tejido. De manera similar, la Figura 7 ilustra una lámina de matriz de tejido 70 que puede incluir una superficie convexa superior 74 y una superficie convexa inferior 76, que puede ser adecuada para su uso en el soporte de un implante mamario después de la reconstrucción o el aumento mamario, y la matriz 70 puede tratarse a lo largo de las líneas 72 seleccionadas para aumentar la resistencia o el módulo elástico de la matriz en la dirección que es más probable que falle durante el uso. De manera similar, la Figura 8 ilustra una matriz con forma cilíndrica 80 que tiene un patrón de tratamiento 82 a lo largo de líneas paralelas a un eje de la matriz 80. La matriz con forma cilíndrica 80 se puede usar como un reemplazo de tejido conectivo (por ejemplo, para un ligamento, tendón o línea alba), y el patrón 82 se puede seleccionar para proporcionar la resistencia, flexibilidad o propiedades elásticas deseadas para imitar los sitios de tejido natural y/o para minimizar las tasas de fracaso después de la implantación.

20 La concentración, la velocidad de flujo, y la enzima o sustancia química específica utilizada para la reticulación y, opcionalmente, la proteólisis, se pueden seleccionar por una variedad de razones. Por ejemplo, en general, la concentración y la velocidad de flujo/tiempo de exposición específicos se seleccionan en base al grado deseado de reticulación, y opcionalmente a la proteólisis. Además, dado que diferentes agentes de reticulación, y opcionalmente enzimas, pueden tener efectos proteolíticos o de reticulación sobre diferentes aminoácidos, se pueden usar combinaciones de dos o más agentes de reticulación y opcionalmente enzimas.

#### Matrices de tejido acelular

30 Los métodos de la presente descripción pueden usarse para proporcionar la modificación localizada de propiedades de cualquier matriz de tejido, incluyendo la matriz de tejido de tejidos celularizados, tejido parcialmente descelularizado o matrices fabricadas artificialmente. Sin embargo, en algunas modalidades, las matrices de tejido incluyen una matriz de tejido acelular. El término "matriz de tejido acelular", como se usa en el presente documento, se refiere generalmente a cualquier matriz de tejido que esté sustancialmente libre de células y/o componentes celulares.

35 Las matrices de tejidos pueden procesarse de varias maneras, como se describe a continuación para producir tejidos descelularizados o parcialmente descelularizados. Las etapas de procesamiento descritas a continuación se pueden usar junto con y (tanto antes o después) de los procesos descritos en este documento para producir matrices de tejidos que tienen variaciones mecánicas y/o propiedades biológicas.

40 En general, las etapas involucradas en la producción de una matriz de tejido acelular incluyen la recolección del tejido de un donante (por ejemplo, un cadáver humano o una fuente animal) y la extracción de células en condiciones que preservan la función biológica y estructural. En ciertas modalidades, el proceso incluye tratamiento químico para estabilizar el tejido y evitar la degradación bioquímica y estructural junto con o antes de la extracción de células. En diversas modalidades, la solución estabilizadora detiene y previene la degradación osmótica, hipóxica, autolítica y proteolítica, protege contra la contaminación microbiana y reduce el daño mecánico que puede ocurrir con tejidos que contienen, por ejemplo, componentes del músculo liso (por ejemplo, vasos sanguíneos). La solución estabilizadora puede contener un tampón apropiado, uno o más antioxidantes, uno o más agentes oncóticos, uno o más antibióticos, uno o más inhibidores de la proteasa, y/o uno o más relajantes del músculo liso.

50 Luego, el tejido se coloca en una solución de descelularización para eliminar células viables (por ejemplo, células epiteliales, células endoteliales, células de músculo liso y fibroblastos) de la matriz estructural sin dañar la integridad biológica y estructural de la matriz de colágeno. La solución de descelularización puede contener un tampón apropiado, sal, un antibiótico, uno o más detergentes (por ejemplo, TRITON X-100™, desoxicolato de sodio, monooleato de polioxitileno sorbitán (20)), uno o más agentes para evitar la reticulación, uno o más inhibidores de proteasa y/o una o más enzimas. En algunas modalidades, la solución de descelularización comprende 1 % de TRITON X-100™ en medio RPMI con Gentamicina y 25 mM de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético). En algunas modalidades, el tejido se incuba en la solución de descelularización durante la noche a 37 °C con agitación suave a 90 rpm. En ciertas modalidades, se pueden usar detergentes adicionales para eliminar la grasa de la muestra de tejido. Por ejemplo, en algunas modalidades, se agrega desoxicolato de sodio al 2 % a la solución de descelularización.

60 La piel, partes de la piel (por ejemplo, la dermis) y otros tejidos tales como vasos sanguíneos, válvulas cardíacas, fascia, cartílago, hueso, y tejido conectivo nervioso pueden usarse para crear matrices acelulares dentro del alcance de la presente divulgación. Las matrices de tejido acelular se pueden probar o evaluar para determinar si están sustancialmente libres de células y/o componentes celulares de varias maneras. Por ejemplo, los tejidos procesados se pueden inspeccionar con microscopía óptica para determinar si quedan células (vivas o muertas) y/o componentes celulares.

Además, ciertos ensayos pueden usarse para identificar la presencia de células o componentes celulares. Por ejemplo, se pueden usar ensayos de ADN u otros ácidos nucleicos para cuantificar los materiales nucleares restantes dentro de las matrices de tejidos. En general, la ausencia de ADN restante u otros ácidos nucleicos será indicativo de una descelularización completa (es decir, eliminación de células y/o componentes celulares). Finalmente, se pueden usar otros ensayos que identifiquen componentes específicos de la célula (por ejemplo, antígenos de superficie) para determinar si las matrices de tejido son acelulares. La piel, partes de la piel (por ejemplo, la dermis) y otros tejidos tales como vasos sanguíneos, válvulas cardíacas, fascia, cartilago, hueso, y tejido conectivo nervioso pueden usarse para crear matrices acelulares dentro del alcance de la presente divulgación.

Después del proceso de descelularización, la muestra de tejido se lava minuciosamente con solución salina. En algunas modalidades ilustrativas, por ejemplo, cuando se usa material xenogénico, el tejido descelularizado se trata durante la noche a temperatura ambiente con una solución de desoxirribonucleasa (DNasa). En algunas modalidades, la muestra de tejido se trata con una solución de DNasa preparada en tampón de DNasa (20 mM de HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetano sulfónico), 20 mM de CaCl<sub>2</sub> y 20 mM de MgCl<sub>2</sub>). Opcionalmente, se puede agregar una solución antibiótica (por ejemplo, gentamicina) a la solución de DNasa. Se puede usar cualquier tampón adecuado siempre que el tampón proporcione una actividad DNasa adecuada.

Mientras que una matriz de tejido acelular puede hacerse a partir de uno o más individuos de la misma especie que el receptor del injerto de matriz de tejido acelular, este no es necesariamente el caso. Así, por ejemplo, una matriz de tejido acelular puede hacerse 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, sin limitación, mamíferos, tales como humanos, primates no humanos (por ejemplo, monos, babuinos o chimpancés), cerdos, vacas, caballos, cabras, ovejas, perros, gatos, conejos, conejillos de indias, jerbos, hámsteres, ratas o ratones.

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

Dado que los mamíferos no primates (por ejemplo, los cerdos) producen epítomos  $\alpha$ -gal, el xenotrasplante de material que contiene colágeno de estos mamíferos en primates a menudo resulta en rechazo debido a la unión anti-Gal de los primates a estos epítomos en el material que contiene colágeno. La unión da como resultado la destrucción del material que contiene colágeno por fijación del complemento y por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. U. Galili y otros, *Immunology Today* 14: 480 (1993); M. Sandrin y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 11391 (1993); H. Good y otros, *Transplant. Proc.* 24: 559 (1992); B. H. Collins y otros, *J. Immunol.* 154: 5500 (1995). Además, el xenotrasplante da como resultado una activación importante del sistema inmune para producir mayores cantidades de anticuerpos anti-gal de alta afinidad. Por consiguiente, en algunas modalidades, cuando los animales que producen epítomos  $\alpha$ -gal se utilizan como fuente de tejido, la eliminación sustancial de los epítomos  $\alpha$ -gal de las células y de los componentes extracelulares del material que contiene colágeno, y la prevención de la reexpresión de los epítomos  $\alpha$ -gal celulares pueden disminuir la respuesta inmune contra el material que contiene colágeno asociado con la unión del anticuerpo anti-gal a los epítomos  $\alpha$ -gal.

Para eliminar los epítomos  $\alpha$ -gal, después de lavar el tejido minuciosamente con solución salina para eliminar la solución de DNasa, la muestra de tejido puede someterse a uno o más tratamientos enzimáticos para eliminar ciertos antígenos inmunogénicos, si están presentes en la muestra. En algunas modalidades, la muestra de tejido puede tratarse con una enzima  $\alpha$ -galactosidasa para eliminar los epítomos  $\alpha$ -gal si están presentes en el tejido. En algunas modalidades, la muestra de tejido se trata con  $\alpha$ -galactosidasa a una concentración de 300 U/L preparada en 100 mM de tampón fosfato a pH 6,0. En otras modalidades, la concentración de  $\alpha$ -galactosidasa se incrementa a 400 U/L para la eliminación adecuada de los epítomos  $\alpha$ -gal del tejido cultivado. Se puede usar cualquier concentración de enzima y tampón adecuados siempre que se logre una eliminación suficiente de antígenos.

Alternativamente, en lugar de tratar el tejido con enzimas, los animales que han sido modificados genéticamente para carecer de uno o más epítomos antigénicos pueden seleccionarse como la fuente de tejido. Por ejemplo, los animales (por ejemplo, los cerdos) que han sido modificados genéticamente para carecer del resto de  $\alpha$ -galactosa terminal pueden seleccionarse como la fuente de tejido. Para las descripciones de los animales apropiados, véase la solicitud de Estados Unidos pendiente núm. de serie 10/896,594 y la patente de Estados Unidos núm. 6,166,288. Además, se describen ciertos métodos ilustrativos de procesamiento de tejidos para producir matrices acelulares con o sin cantidades reducidas o que carecen de restos alfa-1,3-galactosa en Xu, Hui y otros, "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 que se forma la matriz de tejido acelular, se pueden cultivar opcionalmente células viables histocompatibles en

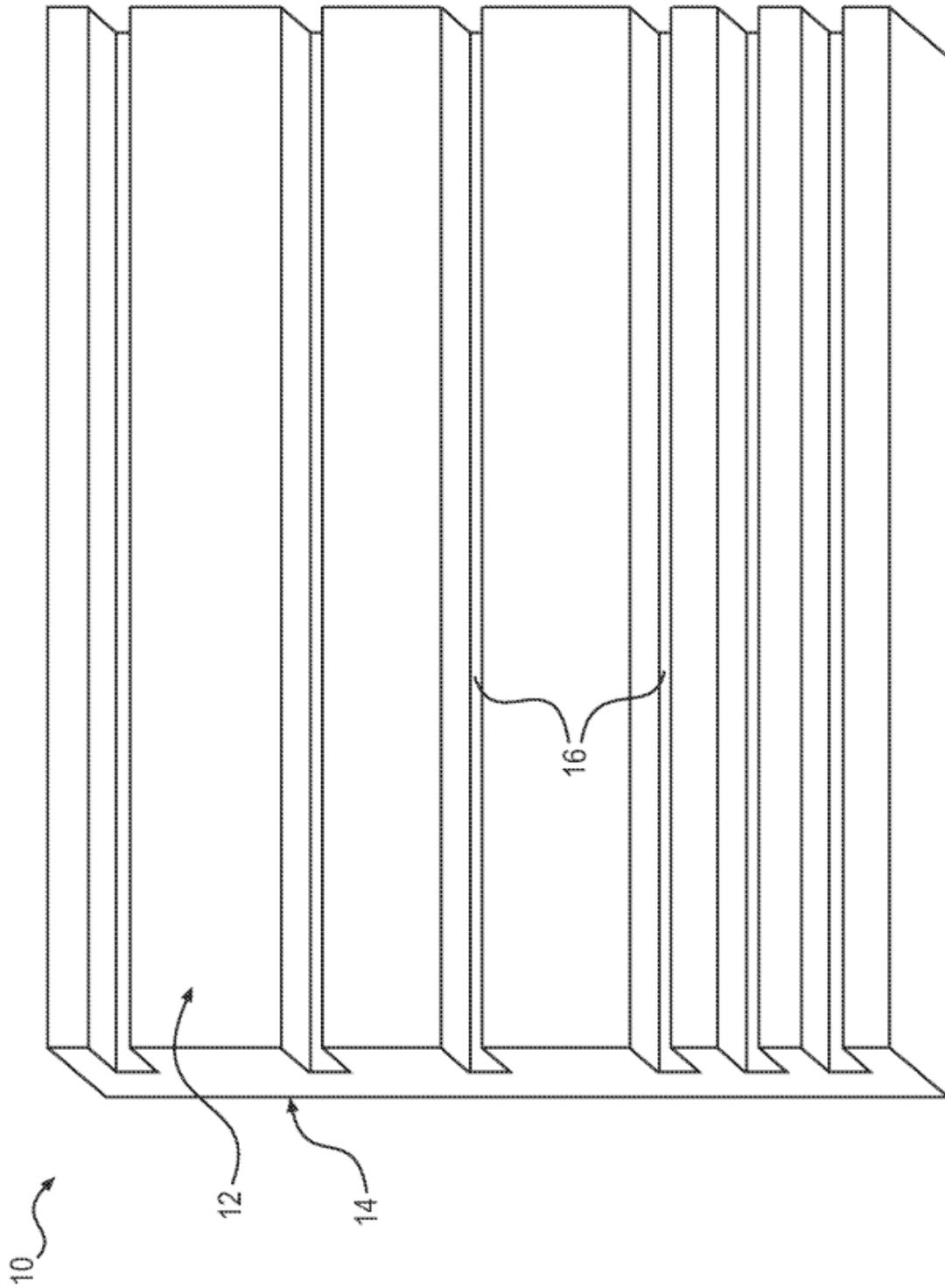
la matriz de tejido acelular para producir un injerto que puede ser remodelado adicionalmente por el huésped. En algunas modalidades, se pueden agregar células viables histocompatibles a las matrices mediante técnicas de cocultivo de células in vitro estándar antes del trasplante, o mediante repoblación in vivo después del trasplante. La repoblación in vivo puede ser por las propias células del receptor que migran hacia la matriz de tejido acelular o por infusión o inyección de células obtenidas del receptor o células histocompatibles de otro donante en la matriz de tejido acelular in situ. Se pueden usar varios tipos de células, incluidas las células madre embrionarias, las células madre adultas (por ejemplo, las células madre mesenquimales), y/o las células neuronales. En diversas modalidades, las células se pueden aplicar directamente a la porción interna de la matriz de tejido acelular justo antes o después de la implantación. En ciertas modalidades, las células pueden colocarse dentro de la matriz de tejido acelular a implantar, y cultivarse antes de la implantación.

5

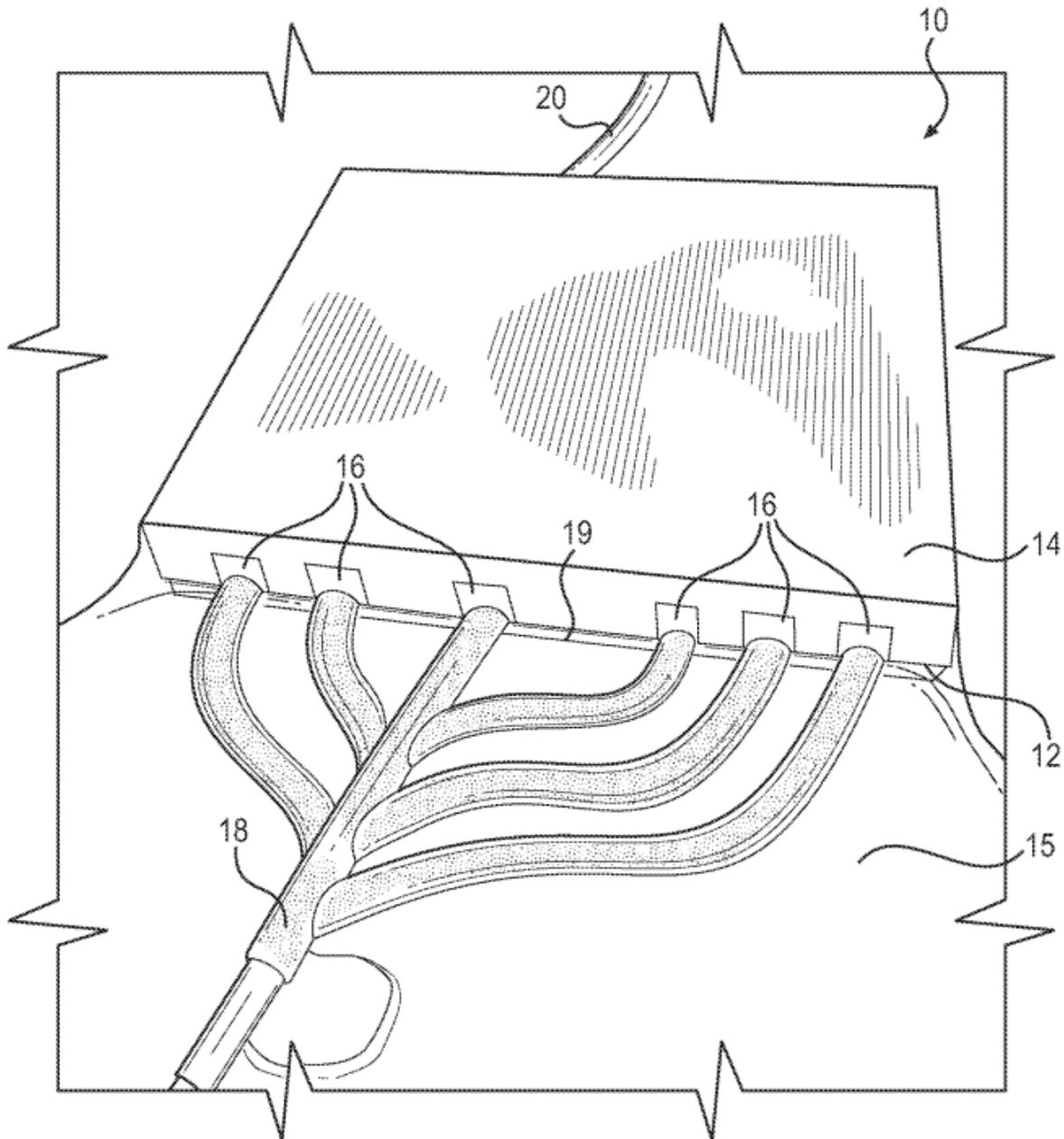
10

**REIVINDICACIONES**

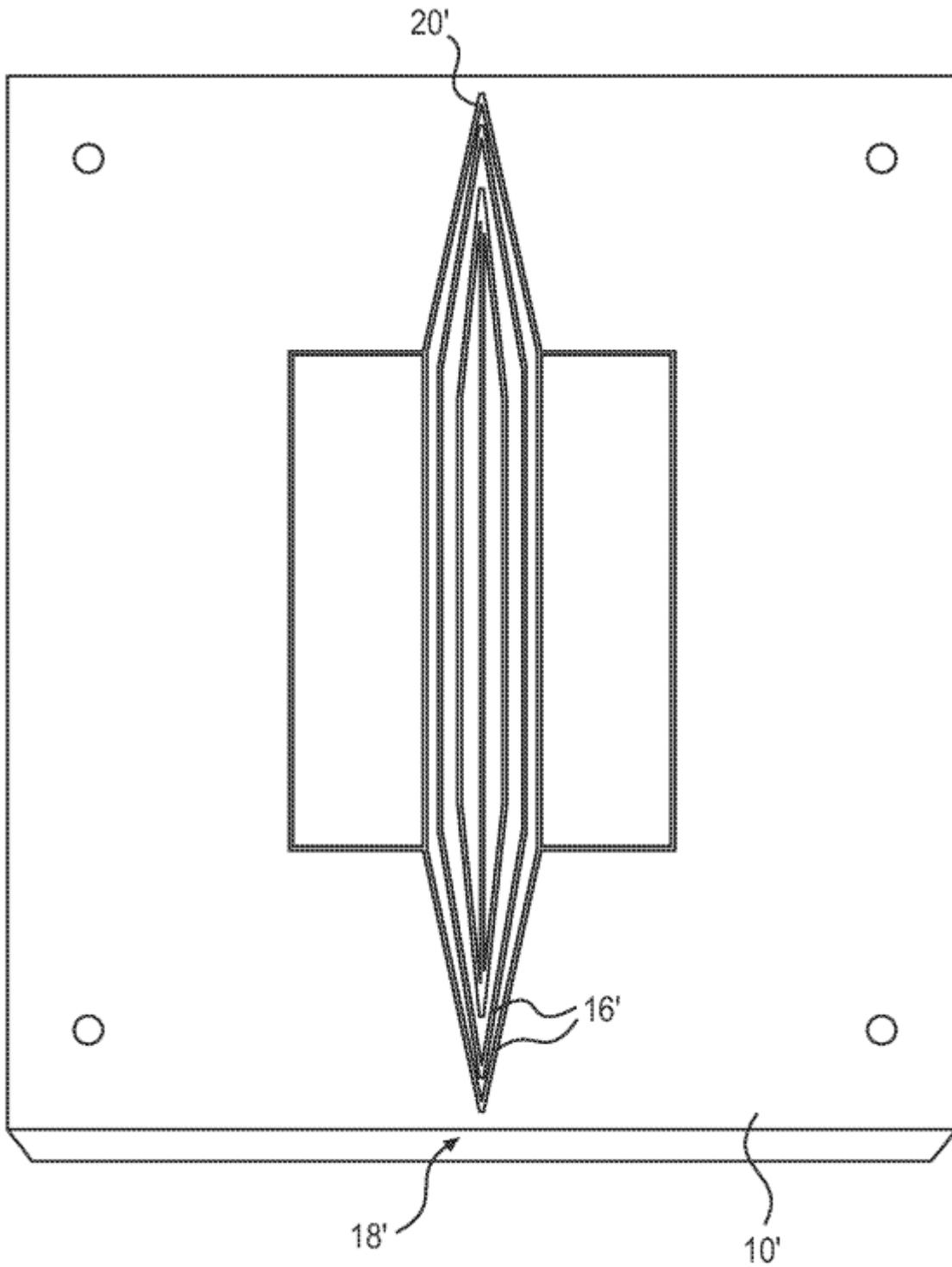
1. Un método para tratar una matriz de tejido, que comprende:  
5 seleccionar una matriz de tejido que contiene colágeno;  
proporcionar una superficie sólida que tiene uno o más canales configurados para permitir que el fluido fluya a  
través de estos;  
poner en contacto la matriz de tejido con la superficie; y  
hacer que un fluido que contiene un agente de reticulación fluya a través de los canales para reticular las porciones  
10 seleccionadas de la matriz de tejido para producir una matriz de tejido que tiene propiedades mecánicas o  
biológicas que varían a través de la matriz de tejido.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la matriz de tejido es una matriz de tejido acelular.
3. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la matriz de tejido comprende una matriz de tejido  
15 dérmico.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la matriz de tejido se deriva de un tejido  
seleccionado de fascia, tejido pericárdico, duramadre, tejido del cordón umbilical, tejido placentario, tejido de la  
20 válvula cardíaca, tejido del ligamento, tejido del tendón, tejido arterial, tejido venoso, tejido conectivo neural, tejido  
de vejiga urinaria, tejido del uréter y tejido intestinal.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 4, en donde el uno o más canales tienen al menos uno de  
un patrón de serpentina, un patrón similar a una red, un patrón circular, un patrón de cuadrícula, y un patrón lineal.
- 25 6. El método de la reivindicación 5, en donde el agente de reticulación comprende al menos uno de glutaraldehído y  
1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida hidrocioruro (EDC).
7. Un producto tisular, que comprende:  
30 una matriz de tejido acelular derivada de un tejido que contiene colágeno, en donde la matriz de tejido comprende  
una lámina flexible, y en donde la matriz de tejido comprende regiones seleccionadas de material reticulado, las  
regiones seleccionadas de la matriz de tejido se han reticulado proporcionando una superficie sólida que tiene uno  
o más canales configurados para permitir que el fluido fluya a través de estos, poniendo en contacto la matriz de  
tejido con la superficie, y haciendo que el fluido que contiene un agente de reticulación fluya a través de los canales,  
35 y  
en donde las propiedades mecánicas o biológicas de la matriz de tejido varían a través de la lámina flexible.
8. El producto de la reivindicación 7, en donde la matriz de tejido comprende una matriz de tejido dérmico.
9. El producto de la reivindicación 7, en donde la matriz de tejido se deriva de un tejido seleccionado de fascia, tejido  
40 pericárdico, duramadre, tejido de cordón umbilical, tejido placentario, tejido de válvula cardíaca, tejido de ligamento,  
tejido de tendón, tejido arterial, tejido venoso, tejido conectivo neural, tejido de vejiga urinaria, tejido del uréter y  
tejido intestinal.
- 45 10. El producto de cualquiera de las reivindicaciones 7 a la 9, en donde las porciones seleccionadas de la matriz de  
tejido tienen al menos uno de un patrón de serpentina, un patrón similar a una red, un patrón circular, un patrón de  
cuadrícula y un patrón lineal.



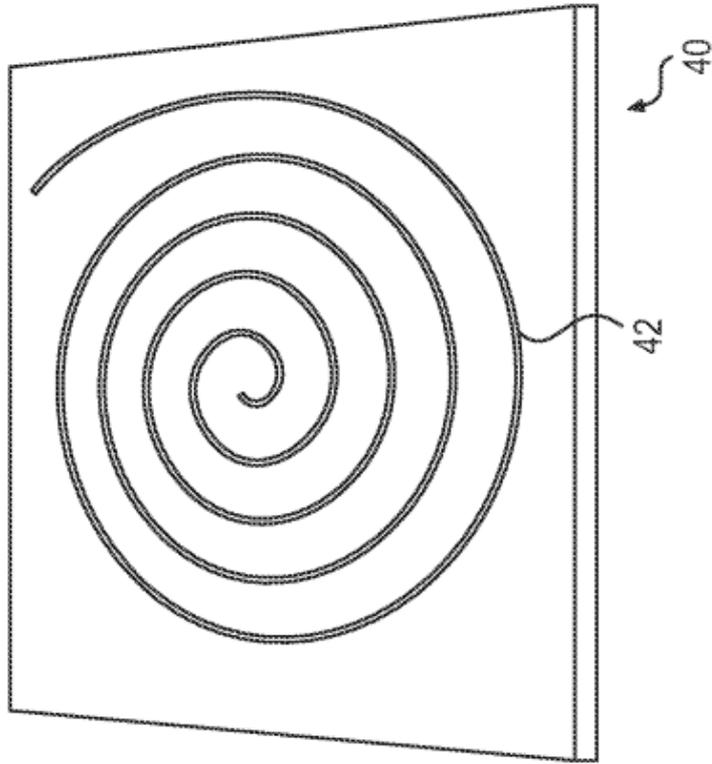
**FIG. 1A**



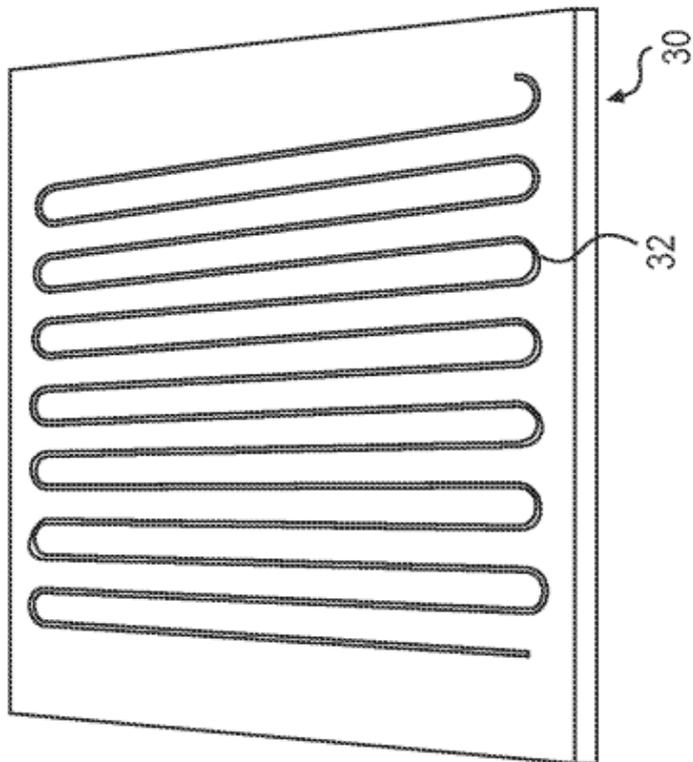
**FIG. 1B**



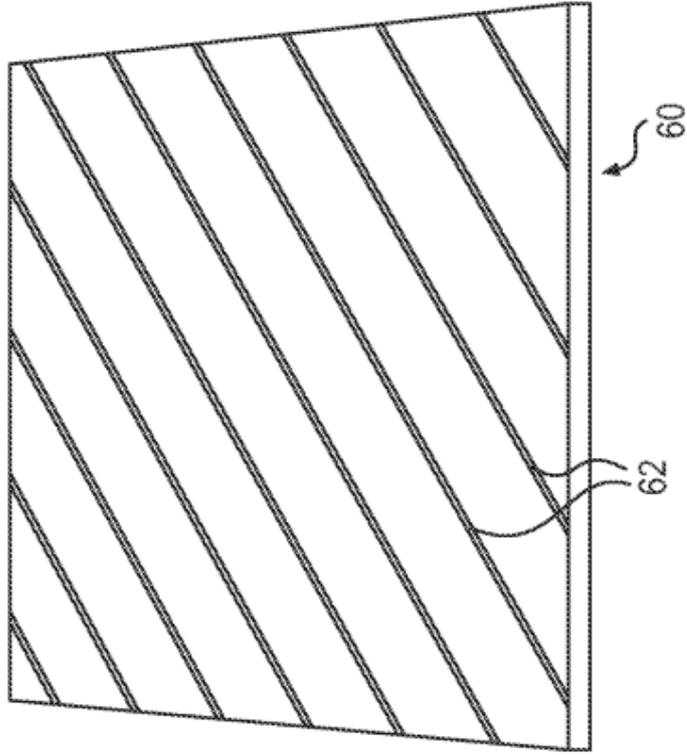
**FIG. 2**



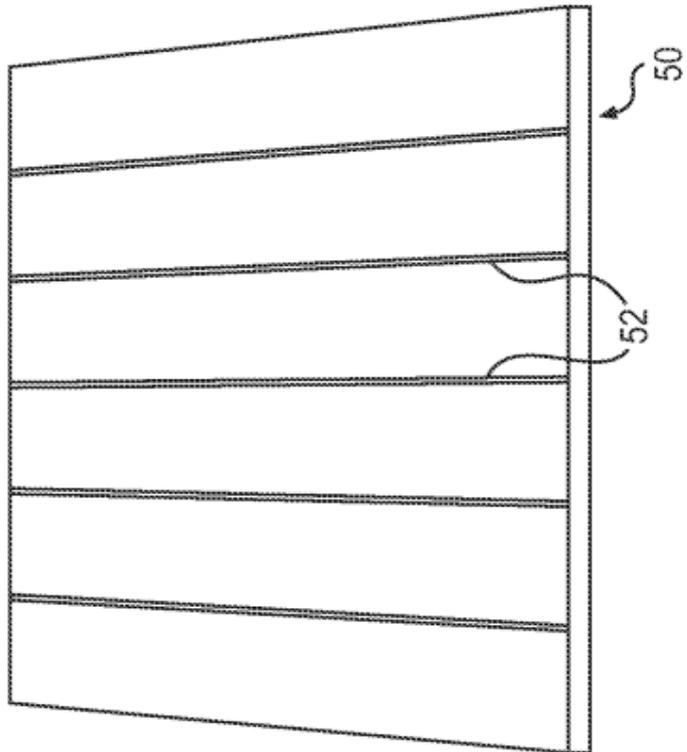
**FIG. 4**



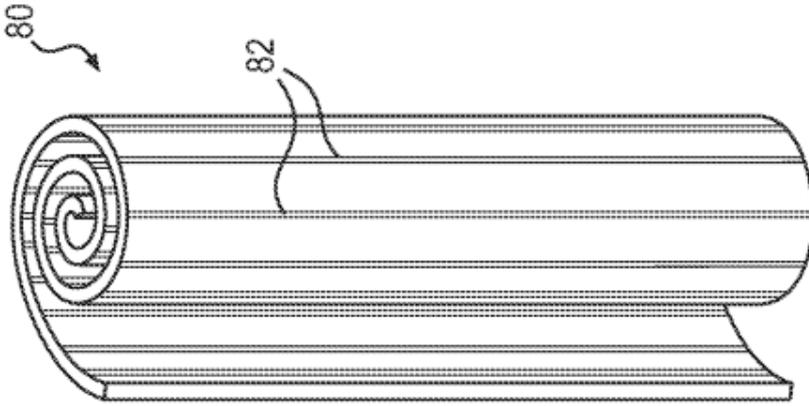
**FIG. 3**



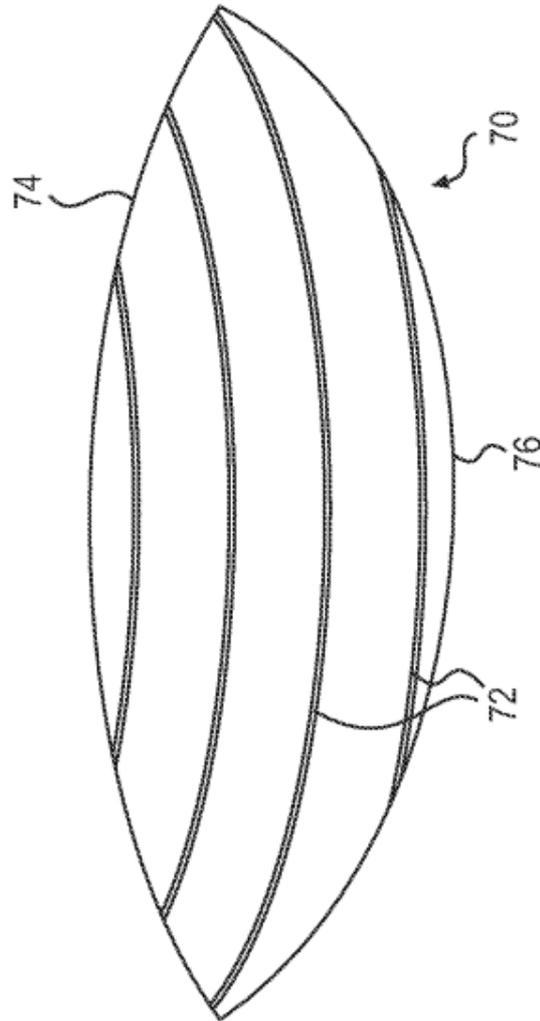
**FIG. 6**



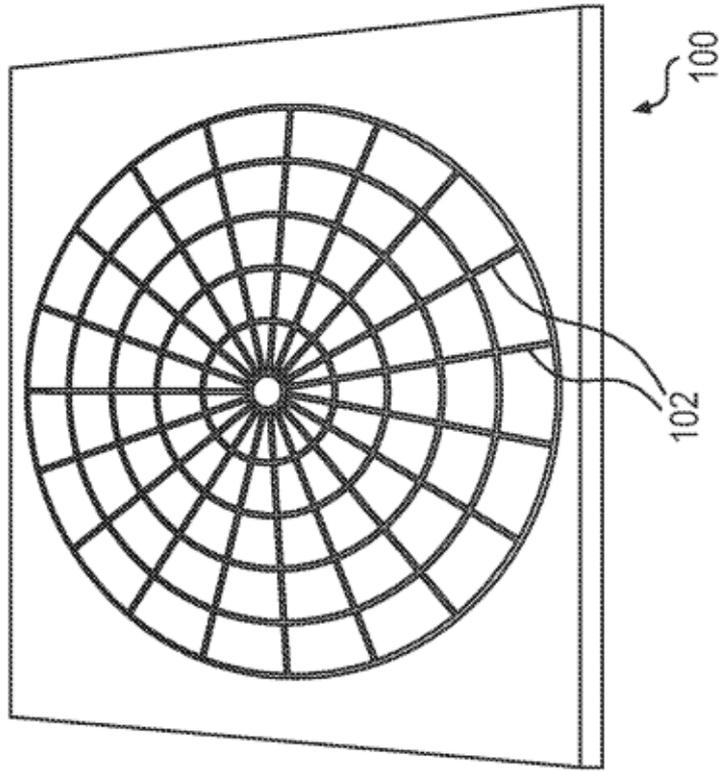
**FIG. 5**



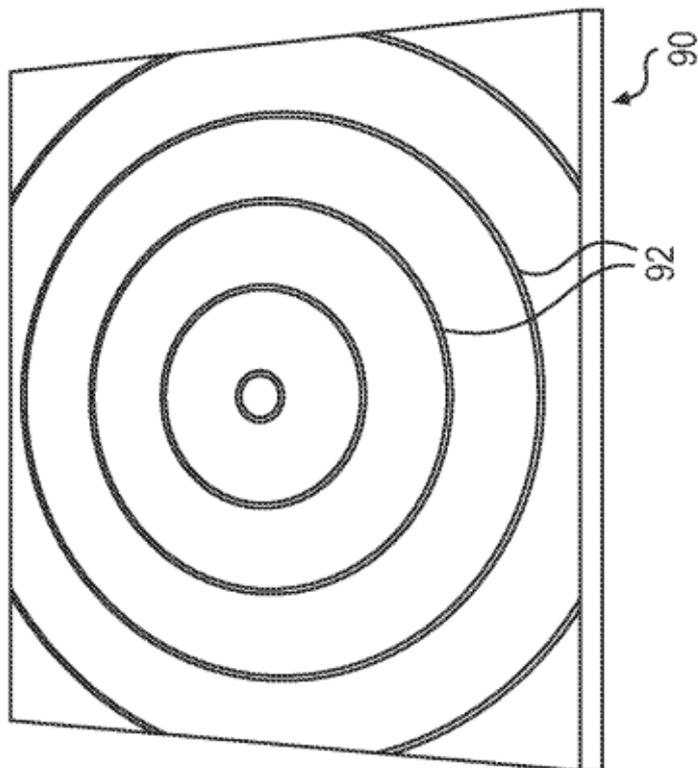
**FIG. 8**



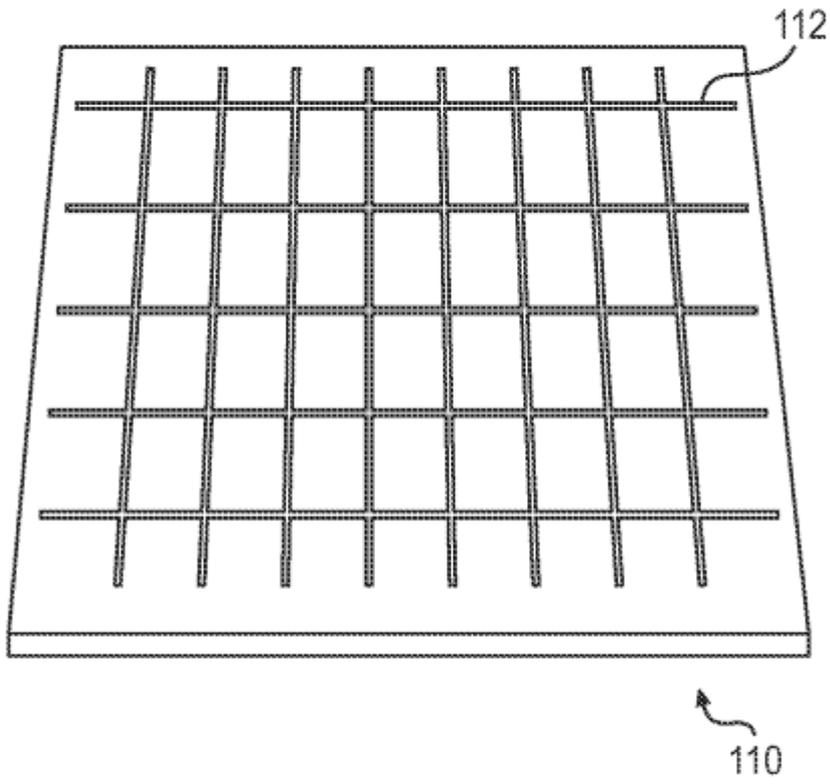
**FIG. 7**



**FIG. 10**



**FIG. 9**



**FIG. 11**