



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) BR 112016009178-7 B1**



**(22) Data do Depósito: 04/11/2014**

**(45) Data de Concessão: 15/12/2020**

**(54) Título:** MÉTODO DE PREPARAÇÃO DE UM PRODUTO DE TECIDO E USO DE UM PRODUTO DE TECIDO

**(51) Int.Cl.:** A61L 27/36.

**(30) Prioridade Unionista:** 04/11/2013 US 61/899,647.

**(73) Titular(es):** LIFECELL CORPORATION.

**(72) Inventor(es):** HUI XU; TING HUANG LI; HUA WAN; RICK OWENS; NATHANIEL BACHRACH.

**(86) Pedido PCT:** PCT US2014063796 de 04/11/2014

**(87) Publicação PCT:** WO 2015/066668 de 07/05/2015

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 25/04/2016

**(57) Resumo:** MÉTODO DE PREPARAÇÃO DE UM PRODUTO DE TECIDO, E, USO DE UM PRODUTO DE TECIDO São proporcionados produtos de tecido sem uma percentagem desejada de epítopos imunogênicos, tais como epítopos de galactose alfa-1,3 galactose. Métodos de produção e utilização dos produtos de tecido são também proporcionados.

MÉTODO DE PREPARAÇÃO DE UM PRODUTO DE TECIDO E USO DE UM PRODUTO DE TECIDO

[001] Esse pedido reivindica prioridade de acordo com 35 USC § 119 para o Pedido Provisório dos Estados Unidos Número 61/899,647, que foi apresentado a 3 de novembro de 2013, e que é incorporado por referência na sua totalidade.

[002] A presente revelação se refere em geral a métodos de preparação e utilização de matrizes de tecido sem alguns ou todos os epítopos da galactose alfa-1,3-galactose.

[003] Vários produtos derivados de tecido são usados para reparar, regenerar, cicatrizar, ou de outro modo tratar tecidos e órgãos doentes ou danificados. Tais produtos podem incluir transplantes de tecidos intactos e/ou tecidos parcialmente ou completamente descelularizados. Esses produtos de tecido podem ser proporcionados a partir de várias fontes dadoras, incluindo tecido colhido do receptor (i.e., autotransplantes), de outro membro da mesma espécie (i.e., alotransplantes), ou de uma espécie diferente (i.e., xenotransplantes). Embora os autotransplantes e os alotransplantes possam reduzir a possibilidade de rejeição devido à expressão de proteínas específicas da espécie no tecido dador, essas fontes dadoras podem ser impraticáveis ou incapazes de proporcionar material suficiente no momento da utilização cirúrgica.

[004] Assim, podem ser procuradas fontes de xenotransplante alternativas. Um problema com a xenotransplantação é que o dador pode expressar enzimas ou outras proteínas no tecido que não são expressas pelo

receptor, aumentando a possibilidade de rejeição. Por exemplo, animais (p. ex., seres humanos ou outros primatas) que não expressem a enzima UDP-galactose:beta-D-galactosil-1,4-N-acetil-D-glucosaminida-alfa-1,3-galactosil-transferase ("alfa-1,3-galactosiltransferase" ou "alfa-GT"), que catalisa a formação do dissacarídeo terminal da galactose alfa-1,3-galactose ("alfa-gal"), podem exibir um aumento da resposta imunológica e rejeição hiperaguda de xenotransplantes de animais (p. ex., porcos ou outros mamíferos não primatas) expressando o epítopo alfa-gal na superfície de células em um transplante de tecido.

[005] A eliminação dos epítopos alfa-gal de um produto de tecido pode diminuir a resposta imunológica contra a composição. U. Galili *et al.*, *J. Biol. Chem.* 263: 17755 (1988). Como tal, são necessários métodos para a remoção de epítopos alfa-gal de tecidos dadores destinados a serem implantados em receptores (p. ex., seres humanos) que não expressam epítopos alfa-gal.

[006] Assim, em várias modalidades de realização, são revelados métodos para remoção de alfa-gal de um tecido descelularizado. Os métodos podem compreender a seleção de pelo menos uma matriz de tecido contendo colágeno contendo porções de galactose alfa-1,3-galactose; e colocação em contato de pelo menos uma matriz de tecido com pelo menos uma enzima proteolítica sob condições suficientes para remover porções de galactose alfa-1,3-galactose do tecido.

[007] As enzimas podem incluir alcalase, bromelaína, dispase, ou tripsina. E o método pode compreender ainda a realização de um ensaio para determinar se as porções de galactose alfa-1,3-galactose foram removidas da pelo menos

uma matriz de tecido contendo colágeno.

[008] Produtos de tecido produzidos usando os métodos são também proporcionados. Além disso, são proporcionados métodos de tratamento usando os produtos de tecido ou produtos de tecido produzidos através dos métodos revelados. É ainda proporcionado um produto de tecido tratado enzimaticamente. O produto de tecido pode incluir uma matriz de tecido acelular preparada a partir de um tecido contendo colágeno de tipo selvagem de suíno, em que o tecido contendo colágeno foi tratado enzimaticamente para remover substancialmente todas as porções de galactose alfa-1,3-galactose do tecido usando uma protease que não é especificamente dirigida para porções de galactose alfa-1,3-galactose. Em algumas modalidades de realização, a matriz de tecido é de um animal não primata que produz alfa-galactose, e a matriz de tecido foi ainda processada para remover substancialmente ou completamente a alfa-galactose da matriz de tecido contendo colágeno.

[009] A pelo menos uma matriz de tecido contendo colágeno pode estar contida dentro de um tecido celular, e o método pode compreender ainda descelularização do tecido celular. Em algumas modalidades de realização, a matriz de tecido é completamente descelularizada; e a matriz de tecido pode compreender uma matriz acelular.

[0010] Em algumas modalidades de realização, a enzima proteolítica remove porções de galactose alfa-1,3-galactose sem danificar a pelo menos uma matriz de tecido.

[0011] Em algumas modalidades de realização, o ensaio compreende a medição de uma concentração de porções de galactose alfa-1,3-galactose. O ensaio pode compreender um

ensaio histoquímico ou um imunoensaio.

[0012] A protease pode incluir pelo menos uma de alcalase e tripsina, e a protease é usada a uma concentração variando de cerca de 0,0001% a cerca de 0,1% e durante um período de tempo variando de cerca de 0,5 horas a cerca de 24 horas. A protease pode também incluir pelo menos uma de bromelaína e dispase, e a protease é usada a uma concentração variando de cerca de 10 unidades/litro a cerca de 200 unidades/litro e durante um período de tempo variando de cerca de 1 hora a cerca de 24 horas. O método pode ainda compreender a colocação em contato do tecido com uma alfa-galactosidase.

[0013] A pelo menos uma matriz de tecido contendo colágeno pode compreender uma matriz de tecido de pelo menos um de osso, pele, tecido adiposo, derme, intestino, bexiga urinária, tendão, ligamento, músculo, fáscia, vascular, neurológico, de vaso, de fígado, cardíaco, de pulmão, de rim, e de cartilagem. O tecido pode ser obtido de um ou mais animais ou fontes de tecido diferentes. A pelo menos uma matriz de tecido contendo colágeno pode ser uma matriz de tecido suíno tal como matriz de tecido dérmico acelular suíno.

[0014] O método pode ainda compreender a adição de uma ou mais células viáveis e histocompatíveis ao produto de tecido, tais como células de mamífero, incluindo células estaminais de mamífero.

[0015] Em algumas modalidades de realização, pelo menos um fator adicional selecionado a partir de um agente anti-inflamatório, um analgésico, um fator de crescimento celular, um fator angiogênico, um fator de

diferenciação, uma citocina, uma hormona, e uma quimocina é adicionado ao produto de tecido. O pelo menos um fator adicional pode ser codificado por uma sequência de ácido nucleico contida em um vetor de expressão, que pode estar contida em uma ou mais células viáveis e histocompatíveis.

[0016] O método pode compreender ainda o tratamento da pelo menos uma matriz de tecido contendo colágeno para reduzir a biocarga. O tratamento da pelo menos uma matriz de tecido contendo colágeno para reduzir a biocarga pode compreender irradiação do produto de tecido.

#### DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0017] As Figuras 1A-1H são desenhos a preto e branco ilustrando os resultados da coloração imuno-histoquímica para porções alfa-gal com amostras de derme acelular suína não tratada (sem enzima usada para remover alfa-gal), e de derme acelular suína tratada com bromelaína, alcalase, e tripsina, cada uma com e sem tratamento de alfa-galactosidase, de acordo com os métodos do Exemplo 1.

[0018] A Figura 2 ilustra os resultados de medições de inibição de ELISA da percentagem de alfa-gal restante em matrizes dérmicas acelulares como controles não tratados, e matrizes dérmicas acelulares tratadas com várias enzimas.

#### DESCRIÇÃO DE CERTAS MODALIDADES DE REALIZAÇÃO EXEMPLARES

[0019] Será feita agora referência em detalhe a certas modalidades de realização exemplares de acordo com a presente revelação, certos exemplos das quais são ilustrados nos desenhos acompanhantes.

[0020] Os títulos das seções usadas aqui são

apenas para fins organizacionais e não devem ser interpretados como limitando o assunto descrito. Todos os documentos, ou porções de documentos, citados no presente pedido, incluindo, mas não se limitando a patentes, pedidos de patente, artigos, livros e tratados, são aqui expressamente incorporados por referência na sua totalidade para qualquer finalidade. Na medida em que as publicações e patentes ou pedidos de patente incorporados por referência contradigam a invenção contida na descrição, a descrição substituirá qualquer material contraditório.

[0021] Nesse pedido, o uso do singular inclui o plural a menos que especificamente indicado de outra forma. Também nesse pedido, o uso de "ou" significa "e/ou" a menos que indicado de outra forma. Além disso, o uso do termo "incluindo" bem como outras formas, tais como "inclui" e "incluso", não são limitantes. Qualquer intervalo aqui descrito será compreendido como incluindo os limites e quaisquer valores entre os limites.

[0022] São aqui divulgados métodos para a preparação de produtos de tecido possuindo imunogenicidade reduzida quando implantados em seres humanos ou primatas não humanos através de remoção de algum ou de todos os epítopos alfa-gal. Vários tecidos humanos ou de outro animal e vários métodos podem ser usados para preparar os produtos de tecido. Por exemplo, as composições podem ser preparadas através de seleção de um tecido de suíno; opcionalmente descelularizando o tecido para produzir uma matriz de tecido contendo colágeno; e expondo o tecido a uma ou mais proteases, p. ex., alcalase, bromelaína, tripsina, e/ou dispase, durante um período de tempo e a uma concentração suficientes para

remover uma quantidade desejada de porções alfa-gal. Em algumas modalidades de realização, a remoção das porções alfa-gal pode ser medida e/ou confirmada após exposição à protease. Em certas modalidades de realização, a enzima pode incluir uma enzima que não é uma alfa-galactosidase, i.e., não é específica para a clivagem da alfa-galactose.

[0023] Em várias modalidades de realização, os produtos de tecido podem compreender tecido intacto, matrizes de tecido parcialmente ou completamente descelularizado, e/ou tecidos descelularizados que tenham sido semeados com uma ou mais células. Em algumas modalidades de realização, a remoção de algum ou de todos os epítopos alfa-gal pode ser confirmada, p. ex., através de medição direta e comparação da concentração de alfa-gal na superfície de uma amostra do produto de tecido tratado com protease contra a concentração num tecido não tratado. Em algumas modalidades de realização, a remoção pode ser confirmada através de comparação da resposta imunológica e/ou inflamatória no tecido tratado com protease contra a resposta num tecido não tratado.

[0024] Tal como aqui usado, o termo "matriz de tecido" se refere a uma estrutura tridimensional de colágeno e proteína formando uma rede de fibras possuindo uma forma e orientação semelhantes à forma e orientação de uma rede de colágeno e proteína verificada num tecido de ocorrência natural. As células do tecido de ocorrência natural podem ser removidas para proporcionar uma matriz de tecido acelular.

[0025] De acordo com várias modalidades de realização, os materiais e métodos aqui proporcionados podem ser usados para produzir um produto de tecido que seja um implante biocompatível (p. ex., um transplante de tecido

biocompatível). Tal como aqui usado, um implante "biocompatível" é um que tem a capacidade de suportar a migração e proliferação de células nativas do tecido circundante para um produto de tecido implantado e/ou a ser implantado sem indução de uma resposta imunológica substancial. Tal como aqui usado, os termos "células nativas" e "tecido nativo" significam as células ou o tecido presentes no órgão ou tecido receptor antes da implantação de um produto de tecido, ou as células ou o tecido produzidos pelo animal hospedeiro após a implantação. Os implantes biocompatíveis podem suportar a atividade celular nativa necessária para a regeneração, reparação, cicatrização ou tratamento de tecidos e podem não desencadear uma resposta imunológica substancial que impeça tal atividade celular. Tal como aqui usado, uma "resposta imunológica substancial" é uma que impede a regeneração, reparação, cicatrização, ou tratamento parcial ou completo dos tecidos.

[0026] Os produtos de tecido produzidos de acordo com os métodos aqui discutidos podem ser usados, em certas modalidades de realização, para regenerar, reparar, substituir, cicatrizar, aumentar, reforçar, e/ou tratar tecidos nativos que foram danificados ou se perderam devido a várias doenças e/ou danos estruturais (p. ex., de traumatismo, cirurgia, atrofia, e/ou desgaste e degeneração de longo prazo). As composições da presente revelação podem também ser usadas, em certas modalidades de realização, para fins cosméticos para reparar ou alterar a aparência ou o toque de um tecido nativo. Os produtos de tecido produzidos usando os métodos aqui discutidos podem ter respostas inflamatórias ou outras respostas reduzidas e podem assim

reduzir a possibilidade de rejeição de implantes (p. ex., devido a uma resposta imunológica a epítopos xenogênicos tais como alfa-gal em um produto de tecido). Por exemplo, um produto de tecido substancialmente livre de porções alfa-gal pode ser usado como transplante de tecido, reduzindo assim o risco de rejeição ou de uma resposta imunológica inflamatória ao transplante.

REMOÇÃO DE EPÍTOPOS ALFA-1,3-GALACTOSE

[0027] Em várias modalidades de realização, os epítopos alfa-gal podem ser removidos de um produto de tecido antes da transplantação através de exposição do produto de tecido a uma protease tal como alcalase, bromelaína, tripsina, ou dispase a uma concentração suficiente e durante um período de tempo suficiente para remover uma quantidade desejada de epítopos alfa-gal. Em algumas modalidades de realização, a enzima protease é selecionada pela sua capacidade para remover alfa-gal ao mesmo tempo que minimiza os danos na matriz extracelular do tecido. Em algumas modalidades de realização, os métodos aqui são usados para remover alfa-gal sem danificar a matriz extracelular do tecido.

[0028] Em várias modalidades de realização, as enzimas, as concentrações de enzima, e os tempos de tratamento são também selecionados para controlar outras propriedades mecânicas ou biológicas. Por exemplo, as enzimas e condições de tratamento podem ser selecionadas para produzir um produto de tecido com propriedades mecânicas ou biológicas desejáveis, tal como descrito nos Pedidos U.S. correspondentes Números 13/457,791 e 14/019,274.

[0029] Em várias modalidades de realização, os

métodos aqui revelados podem ser usados para remover uma quantidade suficiente de porções alfa-gal de modo a que o produto de tecido não induza uma resposta imunológica substancial após implantação. Em algumas modalidades de realização, os métodos aqui revelados podem ser usados para remover substancialmente todos os epítopos alfa-gal em um produto de tecido (p. ex., pelo menos cerca de 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 99,9, ou 99,99%, ou 100%, ou qualquer percentagem entre elas). Em algumas modalidades de realização, uma percentagem suficiente de epítopos alfa-gal é removida de modo a que os produtos de tecido tenham uma redução de pelo menos cerca de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, ou 100% na inflamação ou resposta imunológica após a implantação, em comparação com a resposta a um tecido não tratado (ou qualquer percentagem entre elas). Em algumas modalidades de realização, uma percentagem suficiente de epítopos alfa-gal é removida de modo a que os produtos de tecido tenham pelo menos cerca de 2, 3, 4, 5, ou mais vezes de redução da inflamação ou resposta imunológica, em comparação com a resposta a um tecido não tratado.

[0030] Os produtos de tecido aqui divulgados podem compreender qualquer tecido adequado para implantação de um animal (p. ex., porcos ou outros mamíferos não primatas) após remoção dos epítopos alfa-gal. Tecido de um ou mais animais diferentes pode ser usado nos produtos de tecido. O tecido pode ser, p. ex., um ou mais de fásia, tecido pericárdico, dura, tecido adiposo, tecido do cordão umbilical, tecido placentário, tecido de válvula cardíaca, tecido de ligamento, tecido de tendão, tecido arterial, tecido venoso, tecido conjuntivo neural, tecido da bexiga

urinária, tecido de ureter, pele, tecido dérmico, tecido cardíaco, tecido dos pulmões, tecido do fígado, e tecido intestinal, entre outras fontes de tecidos exemplares. Em algumas modalidades de realização, o tecido pode ser tecido acelular, parcialmente descelularizado, e/ou descelularizado que tenha sido repovoado com células exógenas, desde que o tecido mantenha pelo menos alguma da armação da matriz extracelular verificada no tecido nativo antes da descelularização. Se for utilizado um tecido descelularizado, esse pode ser descelularizado antes, ao mesmo tempo, ou após o tratamento para remover os epítocos alfa-gal.

[0031] Em algumas modalidades de realização, o tecido em um produto de tecido é proporcionado através de colheita de uma fonte de tecido dadora. Em algumas modalidades de realização, o tecido colhido proporciona uma estrutura de armação extracelular porosa para a qual as células de tecido nativo circundante podem migrar e proliferar após implantação de um produto de tecido num local hospedeiro. Em algumas modalidades de realização, o tecido é parcialmente ou completamente descelularizado. Alternativamente, pode ser usada qualquer outra matriz de tecido descelularizada adequada. Por exemplo, são descritos vários materiais de armação biológica por Badylak *et al.*, e os métodos da presente revelação podem ser usados para produzir um produto de tecido usando qualquer um desses materiais, ou quaisquer outros materiais semelhantes. Badylak *et al.*, "Extracellular Matrix as a Biological Scaffold Material: Structure and Function", *Acta Biomaterialia* (2008), doi:10.1016/j.actbio.2008.09.013, aqui incorporada por referência na sua totalidade.

[0032] Em várias modalidades de realização, os epítopos alfa-gal podem ser removidos de um tecido em um produto de tecido através de exposição a uma enzima protease, tal como alcalase, bromelaína, tripsina, ou dispase a uma concentração suficiente e durante um período de tempo suficiente para remover uma percentagem desejada dos epítopos. Por exemplo, uma amostra de tecido pode ser exposta a alcalase e/ou tripsina a uma concentração variando de cerca de 0,0001% a cerca de 0,1% (p. ex., cerca de 0,0001, 0,0002, 0,0003, 0,0004, 0,0005, 0,0006, 0,0007, 0,0008, 0,0009, 0,001, 0,005, 0,01, 0,05, ou 0,1%, ou qualquer percentagem entre elas). Em algumas modalidades de realização, o tecido pode ser exposto a de cerca de 0,0001% a cerca de 0,1% de alcalase e/ou tripsina durante um período de tempo variando de cerca de 0,5 horas a cerca de 24 horas (p. ex., cerca de 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, ou 24 horas, ou qualquer período de tempo entre elas). Em algumas modalidades de realização, uma concentração de enzima maior é emparelhada com um tempo de incubação mais curto, ou uma concentração menor com um tempo de incubação mais longo. Em algumas modalidades de realização, a exposição a alcalase e/ou tripsina pode ser a uma temperatura variando de cerca de 15-40 °C.

[0033] Em outro exemplo, uma amostra de tecido pode ser exposta a bromelaína e/ou dispase a uma concentração variando de cerca de 10 unidades/litro a cerca de 200 unidades/litro (p. ex., cerca de 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, ou 200 unidades/litro, ou qualquer concentração entre elas). Em algumas modalidades de realização, o tecido pode ser exposto a de cerca de 10

unidades/litro a cerca de 200 unidades/litro de bromelaína e/ou dispase durante um período de tempo variando de cerca de 1 hora a cerca de 24 horas (p. ex., cerca de 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, ou 24 horas, ou qualquer período de tempo entre elas). Em algumas modalidades de realização, uma concentração maior de enzima é emparelhada com um tempo de incubação mais curto, e uma concentração menor com um tempo de incubação mais longo. Em algumas modalidades de realização, a exposição a bromelaína e/ou dispase pode ser a uma temperatura variando de cerca de 15-40 °C.

[0034] Em várias modalidades de realização, uma vantagem da remoção de epítopos alfa-gal através da exposição de um tecido a uma ou mais de alcalase, bromelaína, tripsina, e dispase é que essas enzimas servem também para alterar as propriedades mecânicas do tecido, p. ex., para proporcionar um tecido exibindo um nível desejado de flexibilidade e/ou suavidade (tais como a suavidade e flexibilidade de um tecido humano nativo que está sendo substituído por um xenotransplante). O uso dessas enzimas pode assim evitar ou reduzir a necessidade de passos separados de tratamento para remover alfa-gal e para alterar as propriedades mecânicas do produto de tecido, se assim for desejado. Isso pode reduzir o tempo de processamento para a preparação de um produto de tecido e/ou reduzir o risco de danos nos tecidos durante os procedimentos de processamento e subsequente lavagem. Em algumas modalidades de realização, a concentração e/ou duração da exposição a um ou mais de alcalase, bromelaína, tripsina, e/ou dispase é selecionada para remover substancialmente epítopos alfa-gal e para produzir um produto

de tecido possuindo um grau desejado de flexibilidade e/ou suavidade.

[0035] Em certas modalidades de realização, um tecido exposto a uma ou mais de alcalase, bromelaína, tripsina, e/ou dispase pode ser exposto a um ou mais tratamentos enzimáticos ou químicos adicionais para remover mais epítocos alfa-gal ou outros抗ígenos indesejáveis, p. ex., outros抗ígenos normalmente não expressos pelo animal receptor e portanto suscetíveis de conduzir a uma resposta imunológica e/ou rejeição do produto de tecido implantado. Por exemplo, em certas modalidades de realização, o tecido pode ser tratado com alfa-galactosidase para remover mais porções alfa-galactose ( $\alpha$ -gal). Em outras modalidades de realização, pode ser usada qualquer concentração adequada de alfa-galactosidase e tampão, desde que seja conseguida uma remoção de抗ígeno suficiente. Além disso, certos métodos exemplares de processamento de tecidos para reduzir ou remover porções alfa-1,3-galactose são descritos em Xu *et al.*, *Tissue Engineering*, Vol. 15, 1-13 (2009), que é aqui incorporada por referência na sua totalidade.

[0036] A presença ou ausência de alfa-gal em tecidos tratados pode ser avaliada de várias formas. Por exemplo, em várias modalidades de realização, pode ser utilizada coloração imuno-histoquímica ou imunoensaios tais como ensaios ELISA. Tal coloração pode incluir, por exemplo, a ligação de anticorpo específico para alfa-gal a uma amostra de tecido, e fazendo com que uma molécula repórter seja formada (p. ex., através de ligação de uma enzima ao anticorpo usando um ou mais anticorpos adicionais).

#### PRODUTOS DE TECIDO DESCERVALIZADO

[0037] Em várias modalidades de realização, um produto de tecido pode compreender um tecido intacto ou descelularizado de um mamífero não primata que expresse epítopos alfa-gal e do qual os epítopos alfa-gal foram removidos através de exposição do tecido a uma ou mais enzimas protease, tais como alcalase, bromelaína, tripsina, e/ou dispase. Em algumas modalidades de realização, o tecido pode ser parcialmente ou completamente descelularizado mas retém pelo menos alguns componentes da matriz extracelular para a qual células nativas do tecido circundante de um produto de tecido implantado podem migrar e proliferar, aumentando assim a velocidade ou o nível global de reparação, regeneração, cicatrização, ou tratamento do tecido nativo. A descelularização pode ser feita antes, ao mesmo tempo, e/ou após a exposição do tecido a uma ou mais enzimas proteases, tais como alcalase, bromelaína, tripsina, e/ou dispase. Em uma modalidade de realização, a descelularização é feita após exposição a uma ou mais proteases.

[0038] Em algumas modalidades de realização, um produto de tecido pode ser derivado de qualquer tecido que seja adequado para descelularização e subsequente implantação. Tecidos exemplares incluem, mas não estão limitados a osso, pele, tecido adiposo, derme, intestino, bexiga urinária, tendão, ligamento, músculo, fáscia, tecido neurológico, vaso, fígado, coração, pulmão, rim, cartilagem e/ou qualquer outro tecido adequado. Em certas modalidades de realização, o produto de tecido pode incluir um tecido mole descelularizado. Por exemplo, o produto de tecido pode incluir derme parcialmente ou completamente descelularizada. Em outras modalidades de realização, o produto de tecido pode

compreender submucosa do intestino delgado parcialmente ou completamente descelularizada.

[0039] Métodos exemplares para descelularização de tecido são divulgados na Patente U.S. 6,933,326 e no Pedido de Patente U.S. 2010/0272782, que são aqui incorporados por referência na sua totalidade. Em várias modalidades de realização, os passos gerais envolvidos na produção de uma matriz de tecido parcialmente ou completamente descelularizado incluem colheita de tecido de uma fonte dadora e remoção das células sob condições que conservem a função biológica e estrutural. Em certas modalidades de realização, o tecido colhido pode ser lavado para remover quaisquer crioprotetores residuais e/ou outros contaminantes. As soluções usadas para lavagem podem ser qualquer solução fisiologicamente compatível. Exemplos de soluções de lavagem adequadas incluem água destilada, solução salina tamponada com fosfato (PBS), ou qualquer outra solução salina biocompatível.

[0040] Em certas modalidades de realização, o processo de descelularização inclui tratamento químico para estabilizar o tecido colhido de modo a evitar a degradação bioquímica e estrutural antes, durante, ou após a remoção das células. Em várias modalidades de realização, a solução estabilizante pára e impede degradação osmótica, hipóxica, autolítica, e/ou proteolítica; protege contra contaminação microbiana; e/ou reduz danos mecânicos que possam ocorrer durante a descelularização dos tecidos que contenham, por exemplo, componentes de músculo liso (p. ex., vasos sanguíneos). A solução estabilizante pode conter um tampão apropriado, um ou mais antioxidantes, um ou mais agentes

oncóticos, um ou mais antibióticos, um ou mais inibidores de proteases, e/ou um ou mais relaxantes dos músculos lisos.

[0041] Em várias modalidades de realização, o tecido é então colocado numa solução de descelularização para remover alguma ou todas as células viáveis (p. ex., células epiteliais, células endoteliais, células de músculo liso, e fibroblastos, etc.) da matriz extracelular sem danificar a integridade biológica e/ou estrutural da matriz extracelular. A solução de descelularização pode conter um tampão, sal, um antibiótico, um ou mais detergentes (p. ex., TRITON X-100™, dodecilsulfato de sódio, desoxicolato de sódio, mono-oleato de polioxietileno(20)sorbitano, etc.), um ou mais agentes para prevenir reticulação, um ou mais inibidores de proteases, e/ou uma ou mais enzimas apropriados.

[0042] Em certas modalidades de realização, a descelularização remove completamente ou substancialmente todas as células normalmente presentes no tecido a partir do qual o produto de tecido é derivado. Tal como aqui utilizado, "substancialmente isento de todas as células" significa que o produto de tecido contém menos de 20%, 10%, 5%, 1%, 0,1%, 0,01%, 0,001%, ou 0,0001% (ou qualquer percentagem entre elas) das células que normalmente crescem dentro da matriz acelular do tecido antes da descelularização.

[0043] Os produtos de tecido, tal como aqui divulgados, podem compreender um ou mais elementos compreendendo parcialmente ou completamente tecidos descelularizados possuindo uma matriz de tecido acelular e/ou tecidos intactos que não foram descelularizados. Numa modalidade de realização, o produto de tecido compreende elementos possuindo uma matriz de tecido dérmico acelular. Em

certas modalidades de realização, o tecido descelularizado é selecionado a partir de um ou mais de fáscia, tecido pericárdico, dura, tecido do cordão umbilical, tecido placentário, tecido de válvula cardíaca, tecido de ligamento, tecido de tendão, tecido arterial, tecido venoso, tecido conjuntivo neural, tecido da bexiga urinária, tecido de ureter, pele, tecido dérmico, tecido cardíaco, tecido de pulmão, tecido de fígado, e tecido intestinal.

[0044] Em certas modalidades de realização, após a descelularização de um tecido num produto de tecido, células histocompatíveis/viáveis podem ser opcionalmente semeadas na matriz do tecido acelular. Em algumas modalidades de realização, células histocompatíveis viáveis podem ser adicionadas às matrizes através de técnicas padrão de co-cultura *in vitro* antes do transplante, ou através de repovoamento *in vivo* após o transplante. O repovoamento *in vivo* pode ser através da migração de células nativas do tecido circundante para dentro da matriz de tecido ou através de infusão ou injeção de células histocompatíveis obtidas a partir do receptor ou de outro dador para a matriz de tecido *in situ*. Vários tipos celulares podem ser usados, incluindo células estaminais tais como células estaminais embrionárias e/ou células estaminais de adulto. Quaisquer outras células viáveis que sejam histocompatíveis com o paciente no qual estão sendo implantadas podem também ser usadas. Em algumas modalidades de realização, as células histocompatíveis são células de mamífero. Tais células podem promover a migração, proliferação, e/ou vascularização do tecido nativo. Em certas modalidades de realização, as células podem ser diretamente aplicadas à matriz de tecido imediatamente antes ou após a

implantação.

[0045] Em algumas modalidades de realização, um produto de tecido pode ser tratado para reduzir uma biocarga (i.e., reduzir o número de microrganismos que crescem no tecido). Em algumas modalidades de realização, o produto de tecido é tratado de modo a que não tenha substancialmente nenhuma biocarga (i.e., o produto de tecido é asséptico ou estéril). Tal como aqui usado, "substancialmente toda a biocarga" significa que a concentração de microrganismos crescendo no produto de tecido é de menos de 1%, 0,1%, 0,01%, 0,001%, ou 0,0001% dos que cresciam antes do tratamento da biocarga, ou qualquer percentagem entre elas. Os métodos de redução de biocarga adequados são conhecidos de um habilitado na arte e podem incluir a exposição do produto de tecido a irradiação. A irradiação pode reduzir ou eliminar substancialmente a biocarga. Formas de irradiação adequadas podem incluir radiação gama, radiação por feixe eletrônico, e radiação de raios-X. Outros métodos de irradiação são descritos no Pedido U.S. 2010/0272782, cuja divulgação é aqui incorporada por referência na sua totalidade.

[0046] Em algumas modalidades de realização, um ou mais agentes adicionais podem ser adicionados ao produto de tecido. Em algumas modalidades de realização, o agente adicional pode compreender um agente anti-inflamatório, um analgésico, ou qualquer outro agente terapêutico ou benéfico desejado. Em certas modalidades de realização, o agente adicional pode compreender pelo menos um fator de crescimento ou de sinalização adicionado (p. ex., um fator de crescimento celular, um fator angiogênico, um fator de diferenciação, uma citocina, uma hormona, e/ou uma quimocina). Esses agentes

adicionais podem promover a migração, proliferação, e/ou vascularização do tecido nativo. Em algumas modalidades de realização, o fator de crescimento ou sinalização é codificado por uma sequência de ácido nucleico contida em um vetor de expressão. De preferência, o vetor de expressão está em uma ou mais das células viáveis que podem ser adicionadas, opcionalmente, ao produto de tecido. Tal como aqui utilizado, o termo "vetor de expressão" se refere a qualquer construção de ácido nucleico que seja capaz de ser absorvida por uma célula, contém uma sequência de ácido nucleico codificando uma proteína desejada, e contém as outras sequências de ácido nucleico necessárias (p. ex., promotores, estimuladores, codão de terminação, etc.) para assegurar pelo menos expressão mínima da proteína desejada pela célula.

[0047] Os produtos de tecido, tal como descrito acima, podem ser proporcionados embalados, congelados, liofilizados, e/ou desidratados. Em certas modalidades de realização, os produtos de tecido embalados são estéreis. Por exemplo, um conjunto pode compreender um produto de tecido hidratado, congelado, liofilizado, e/ou desidratado e instruções para a preparação e/ou utilização dos produtos de tecido.

#### EXEMPLOS

[0048] Os seguintes exemplos servem para ilustrar, e de forma alguma limitar, a presente divulgação.

#### TRATAMENTO ENZIMÁTICO DE PADM

[0049] Pele de suíno foi colhida em um matadouro e dividida removendo fisicamente a epiderme e gordura subcutânea. O tecido dérmico remanescente foi descontaminado utilizando soluções antibióticas. Após descontaminação, o

tecido foi processado sob condições assépticas.

[0050] O tecido dérmico foi tratado com uma das enzimas (bromelaína, alcalase, ou tripsina) durante o período de tempo especificado. Tanto para alcalase como para tripsina, as concentrações usadas variaram de 0,1% a 0,00039% e o tempo de tratamento usado variou de 1 hora até de um dia para o outro (provavelmente 16-18 horas). As temperaturas usadas foram temperatura ambiente e 37 °C. Para a bromelaína, as concentrações usadas variaram de 25 unidades/litro a 200 unidades/litro e o tratamento usado variou de 6 horas até de um dia para o outro (provavelmente 16-18 horas). As temperaturas usadas foram temperatura ambiente e 37 °C. Para cada uma das três enzimas (alcalase, bromelaína e tripsina), concentrações mais baixas e/ou tempos de tratamento mais curtos provavelmente também ainda resultarão mas esses não foram ainda testados. Geralmente, quanto menor for a concentração, maior terá de ser o tempo de tratamento para que a ou as enzimas tenham um efeito sobre os tecidos. O tratamento a 37 °C pode também aumentar a taxa e/ou a atividade do tratamento enzimático de modo a que possam ser usadas concentrações mais baixas e/ou tempos de tratamento mais curtos.

[0051] O tecido foi então descelularizado com detergentes para remover as células viáveis. Os restos celulares e químicos residuais foram removidos através de lavagem em PBS. A matriz dérmica acelular de suíno (pADM) resultante foi armazenada à temperatura ambiente até estar pronta para uso.

#### PROCEDIMENTO DE DETECÇÃO DE ALFA-GAL

[0052] A presença de alfa-gal pode ser detectada

usando uma série de anticorpos e reagentes de detecção colorimétricos. Os tecidos são primeiro preservados em uma solução de sacarose e em seguida impregnado em um meio de impregnação (OCT) e congelados em azoto líquido. Os blocos congelados contendo os tecidos foram então cortados em secções finas (mícron) usando um micrótomo criostato e colocados em uma lâmina de microscópio. As lâminas contendo os tecidos foram bloqueadas com uma solução para evitar ligação não específica e depois incubadas com um anticorpo primário, o qual é um anticorpo biotinilado que se liga especificamente a resíduos de alfa-gal. Após o primeiro anticorpo ser lavado, foi adicionado às lâminas um segundo anticorpo (estreptavidina conjugada com peroxidase de rábano). A estreptavidina no segundo anticorpo se liga à biotina no anticorpo primário. Após um período de incubação, o segundo anticorpo também foi lavado após o que um reagente de detecção (DAB) é adicionado às lâminas. DAB deposita uma coloração castanha na lâmina na presença de peroxidase de rábano.

[0053] As Figuras 1A-1H estão incluídas em desenhos a preto e branco representativos da coloração imuno-histoquímica para porções alfa-gal com derme acelular de suíno não tratada (sem enzima usada para remover alfa-gal) (Fig. 1A), de amostras de derme acelular de suíno tratadas com bromelaína (Figs. 1E-1F), alcalase (Figs. 1C-D), e tripsina (Figs. 1G-H), cada uma com e sem tratamento de alfa-galactosidase, de acordo com os métodos do Exemplo 1. Tal como mostrado, as amostras tratadas com bromelaína, tripsina, e alcalase não mostram qualquer coloração para porções alfa-gal.

ENSAIO ELISA QUANTITATIVO DE INIBIÇÃO

[0054] A avaliação quantitativa do teor de  $\alpha$ -Gal foi medida usando um ensaio ELISA de inibição. Várias matrizes dérmicas acelulares (ADM) foram picadas e incubadas com anticorpo anti- $\alpha$ -Gal. Após o período de incubação, o sobrenadante contendo qualquer anticorpo não ligado foi transferido para uma placa de 96 poços revestida com  $\alpha$ -Gal. A quantidade de anticorpo não ligado presente no sobrenadante, que subsequentemente se ligou à placa de poços, foi detectada usando um anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina seguido de substrato de detecção de fosfato de p-Nitrofenilo.

[0055] As ADM que contêm níveis elevados de  $\alpha$ -Gal capturaram a maioria, se não todos dos anticorpos anti- $\alpha$ -Gal deixando muito poucos no sobrenadante e assim uma leitura baixa na placa de poços. Em contraste, as ADM que contêm baixos níveis de  $\alpha$ -Gal capturam apenas níveis baixos, se os houver, de anticorpos anti- $\alpha$ -Gal, deixando a maioria dos anticorpos no sobrenadante. Assim, os sobrenadantes dessas amostras produziram leituras muito altas na placa de poços.

[0056] As leituras das placas de poços foram normalizadas para ambos os controles positivos e negativos. Uma vez que  $\alpha$ -Gal está ausente em tecidos humanos mas presente em tecidos suíños, matrizes dérmicas acelulares humanas (hADM) e matrizes dérmicas acelulares suíñas (pADM) sem tratamento de  $\alpha$ -galactosidase foram utilizadas como o controle negativo e controle positivo, respectivamente. O tratamento de pADM com  $\alpha$ -galactosidase reduziu o teor de  $\alpha$ -Gal para aproximadamente 30% do da pADM não tratada. O tratamento com enzima (Alcalase ou Tripsina) de pADM, na

ausência de  $\alpha$ -galactosidase, reduziu o teor de  $\alpha$ -Gal para níveis comparáveis ou inferiores aos do tratamento de  $\alpha$ -galactosidase (Figura 3).

[0057] Os exemplos anteriores se destinam a ilustrar e de forma alguma limitar a presente revelação. Outras modalidades de realização dos dispositivos e métodos revelados serão aparentes aos habilitados na arte a partir da consideração da descrição e prática dos dispositivos e métodos aqui divulgados.

REIVINDICAÇÕES

1. MÉTODO DE PREPARAÇÃO DE UM PRODUTO DE TECIDO, caracterizado por compreender

a seleção de pelo menos uma matriz de tecido contendo colágeno contendo porções de galactose alfa-1,3-galactose; e

a colocação em contato da pelo menos uma matriz de tecido com pelo menos uma enzima proteolítica selecionada a partir de alcalase sob condições suficientes para remover porções de galactose alfa-1,3-galactose do tecido.

2. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por pelo menos uma matriz de tecido contendo colágeno estar contida em um tecido celular, e em que o método compreende ainda a descelularização do tecido celular.

3. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, caracterizado pela matriz de tecido ser completamente descelularizada.

4. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pela alfa-galactose ser completamente removida da matriz de tecido contendo colágeno.

5. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pela enzima proteolítica remover porções de galactose alfa-1,3-galactose sem danificar pelo menos uma matriz de tecido.

6. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado por compreender ainda a realização de um ensaio para determinar se as porções de galactose alfa-1,3-galactose foram removidas de pelo menos uma matriz de tecido contendo colágeno.

7. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pela protease ser pelo

menos uma de alcalase, e a protease ser usada a uma concentração variando de 0,0001% a 0,1% e durante um período de tempo variando de 0,5 horas a 24 horas.

8. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado por compreender ainda a colocação do tecido em contato com alfa-galactosidase.

9. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado por pelo menos uma matriz de tecido contendo colágeno compreender uma matriz de tecido de pelo menos um de osso, pele, tecido adiposo, derme, intestino, bexiga urinária, tendão, ligamento, músculo, fásia, tecido vascular, neurológico, de vaso, de fígado, cardíaco, de pulmão, de rim, e de cartilagem.

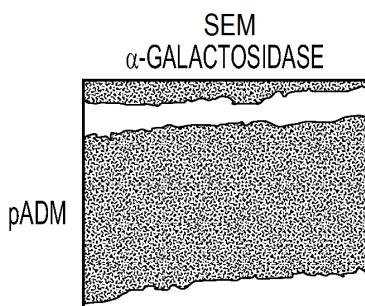
10. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado por pelo menos uma matriz de tecido contendo colágeno ser uma matriz de tecido suína.

11. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por pelo menos uma matriz de tecido contendo colágeno consistir em uma matriz de tecido dérmico acelular suíno.

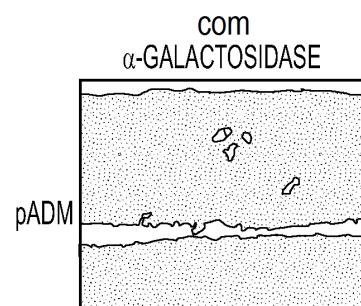
12. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado por compreender ainda a adição de uma ou mais células viáveis e histocompatíveis com o produto de tecido.

13. USO DE UM PRODUTO DE TECIDO, caracterizado por ser preparado através do método, conforme definido nas reivindicações 1 a 12.

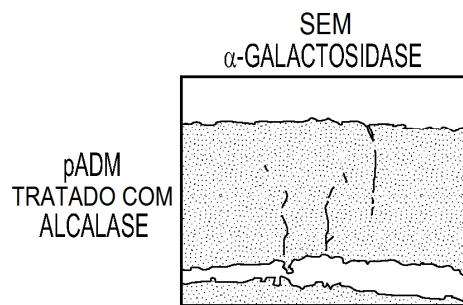
14. USO DE UM PRODUTO DE TECIDO, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por ser na preparação de um dispositivo para tratamento de um defeito em um tecido.



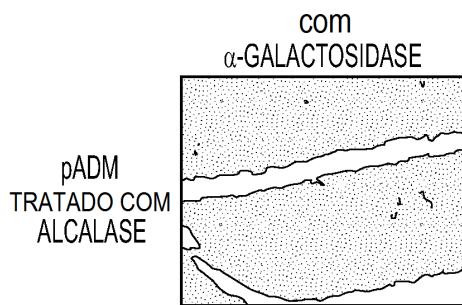
**FIG. 1A**



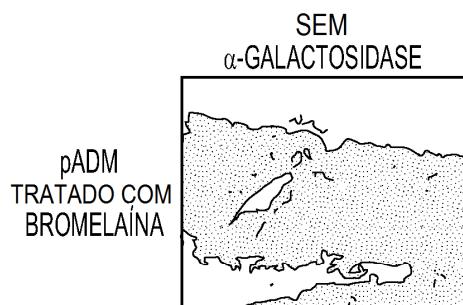
**FIG. 1B**



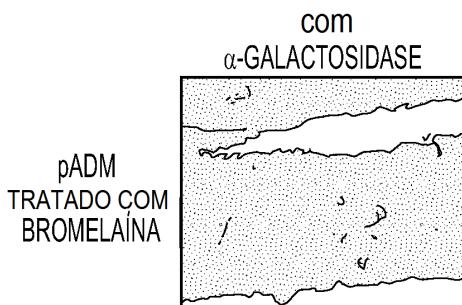
**FIG. 1C**



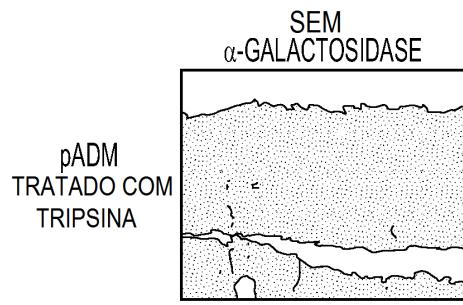
**FIG. 1D**



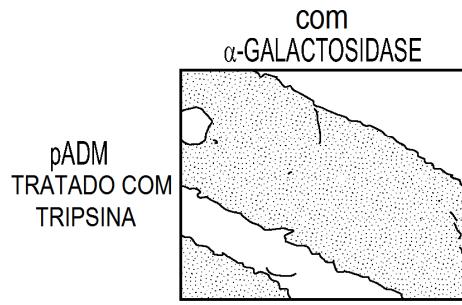
**FIG. 1E**



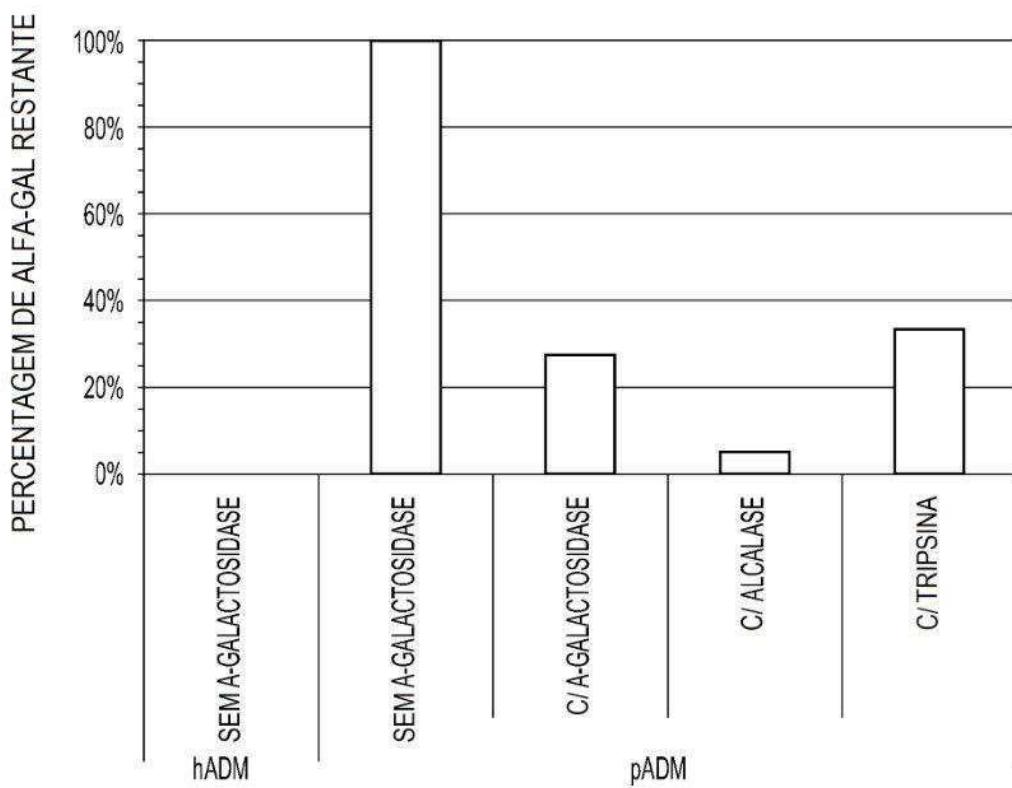
**FIG. 1F**



**FIG. 1G**



**FIG. 1H**



**FIG. 2**