

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 846 758**

(51) Int. Cl.:

A61L 27/36

(2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.11.2014 PCT/US2014/063796**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **07.05.2015 WO15066668**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2014 E 14802997 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.10.2020 EP 3065790**

(54) Título: **Métodos para eliminar la alfa-galactosa**

(30) Prioridad:

04.11.2013 US 201361899647 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.07.2021

(73) Titular/es:

**LIFECELL CORPORATION (100.0%)
5 Giralta Farms
Madison, New Jersey 07940, US**

(72) Inventor/es:

**XU, HUI;
HUANG, LI, TING;
WAN, HUA;
OWENS, RICK y
BACHRACH, NATHANIEL**

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 846 758 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 eliminar la alfa-galactosa

5 Esta solicitud reclama la prioridad bajo 35 USC § 119 a la Solicitud provisional de los Estados Unidos número 61/899,647, que se presentó el 3 de noviembre de 2013.

La presente descripción se refiere en general a métodos para preparar y usar matrices de tejido que carecen de algunos o todos los epítopos de galactosa alfa-1,3-galactosa.

10 Se usan diversos productos derivados de tejidos para reparar, regenerar, curar, o tratar de otra manera tejidos y órganos enfermos o dañados. Tales productos pueden incluir injertos de tejido intacto y/o tejidos descelularizados parcialmente o completamente. Estos productos de tejido pueden proporcionarse a partir de diversas fuentes de donantes, que incluyen el tejido recolectado del receptor (es decir, autoinjertos), de otro miembro de la misma especie (es decir, aloinjertos), o de una especie diferente (es decir, xenoinjertos). Si bien los autoinjertos y aloinjertos pueden reducir la posibilidad de rechazo debido a la expresión de proteínas específicas de la especie en el tejido del donante, esas fuentes del donante pueden ser poco prácticas o incapaces de proporcionar suficiente material en el momento del uso quirúrgico.

20 El documento núm. WO200047131 describe métodos para tratar matrices de tejidos.

En consecuencia, pueden buscarse fuentes de xenoinjertos alternativas. Un problema con el xenotrasplante es que el donante puede expresar enzimas u otras proteínas en el tejido que no son expresadas por el receptor, lo que aumenta la posibilidad de rechazo. Por ejemplo, animales (por ejemplo, seres humanos u otros primates) que no expresan la enzima UDP-galactosa:beta-D-galactosil-1,4-N-acetil-D-glucosaminida alfa-1,3-galactosil-transferasa ("alfa-1,3 galactosiltransferasa" o "alfa GT"), que cataliza la formación del disacárido terminal galactosa alfa-1,3 galactosa ("alfa-gal"), pueden presentar una respuesta inmunitaria aumentada y un rechazo hiperagudo de xenoinjertos de animales (por ejemplo, cerdos u otros mamíferos no primates) que expresan el epítopo alfa-gal en la superficie de las células en un injerto de tejido.

30 La eliminación de los epítopos alfa-gal de un producto de tejido puede disminuir la respuesta inmunitaria contra la composición. U. Galili y otros, J. Biol. Chem. 263: 17755 (1988). Como tal, se necesitan métodos para eliminar los epítopos alfa-gal de los tejidos del donante destinados a la implantación en receptores (por ejemplo, seres humanos) que no expresan epítopos alfa-gal.

35 En consecuencia, en varios aspectos de la descripción, se describen métodos para eliminar alfa-gal de un tejido descelularizado. Los métodos pueden comprender seleccionar al menos una matriz de tejido que contiene colágeno que contiene restos de galactosa alfa-1,3-galactosa; y poner en contacto la al menos una matriz de tejido con al menos una enzima proteolítica en condiciones suficientes para eliminar los restos de galactosa alfa-1,3-galactosa del tejido.

40 Las enzimas pueden incluir alcalasa, bromelina, dispasa, o tripsina. Y el método puede comprender, además, realizar un ensayo para determinar si los restos de galactosa alfa-1,3-galactosa se eliminaron de la al menos matriz de tejido que contiene colágeno.

45 Además, se proporcionan productos de tejidos producidos mediante el uso de los métodos. En adición, se proporcionan métodos de tratamiento que usan los productos de tejido o productos de tejido producidos mediante los métodos descritos. Se proporciona, además, un producto de tejido tratado enzimáticamente. El producto de tejido puede incluir una matriz de tejido acelular preparada a partir de un tejido que contiene colágeno porcino de tipo salvaje, en donde el tejido que contiene colágeno se trató enzimáticamente para eliminar sustancialmente todos los restos de galactosa alfa-1,3-galactosa del tejido mediante el uso de una proteasa que no se dirige específicamente a restos de galactosa alfa-1,3-galactosa. En algunas modalidades, la matriz de tejido es de un animal no primate que produce alfa-galactosa, y la matriz de tejido se sometió a procesos adicionales para eliminar sustancialmente o completamente la alfa-galactosa de la matriz de tejido que contiene colágeno.

55 La al menos una matriz de tejido que contiene colágeno puede contenerse dentro de un tejido celular, y el método puede comprender, además, descelularizar el tejido celular. En algunas modalidades, la matriz de tejido está completamente descelularizada; y la matriz de tejido puede comprender una matriz acelular.

60 En algunas modalidades, la enzima proteolítica elimina restos de galactosa alfa-1,3-galactosa sin dañar la al menos una matriz de tejido.

65 En algunas modalidades, el ensayo comprende medir una concentración de restos de galactosa alfa-1,3-galactosa. El ensayo puede comprender un ensayo histoquímico o un inmunoensayo.

La proteasa puede incluir al menos una de entre alcalasa y tripsina, y la proteasa se usa a una concentración que

varía de aproximadamente 0,0001 % a aproximadamente 0,1 % y durante un período de tiempo que varía de aproximadamente 0,5 horas a aproximadamente 24 horas. La proteasa puede incluir, además, al menos una de bromelina y dispasa, y la proteasa se usa en una concentración que está en el intervalo de aproximadamente 10 unidades/litro a aproximadamente 200 unidades/litro y durante un período de tiempo que varía de aproximadamente 5 1 hora a aproximadamente 24 horas. El método puede comprender, además, poner en contacto el tejido con una alfa-galactosidasa.

La al menos una matriz de tejido que contiene colágeno puede comprender una matriz de tejido de al menos uno de entre tejido de hueso, piel, tejido adiposo, dermis, intestino, vejiga urinaria, tendón, ligamento, músculo, fascia, 10 vascular, neurológico, vascular, hígado, corazón, pulmonar, renal y cartilaginoso. El tejido puede obtenerse de uno o más animales o fuentes de tejido diferentes. La al menos una matriz de tejido que contiene colágeno puede ser una matriz de tejido porcino tal como una matriz de tejido dérmico acelular porcino.

15 El método puede comprender, además, adicionar una o más células viables e histocompatibles al producto de tejido, tales como células de mamífero, que incluyen células madre de mamífero.

20 En algunas modalidades, al menos un factor adicional seleccionado de un agente antiinflamatorio, un analgésico, un factor de crecimiento celular, un factor angiogénico, un factor de diferenciación, una citocina, una hormona, y una quimiocina se adiciona al producto de tejido. El al menos un factor adicional puede codificarse por una secuencia de ácido nucleico contenida en un vector de expresión, que puede contenerse en una o más células viables e histocompatibles.

25 El método puede comprender, además, tratar la al menos una matriz de tejido que contiene colágeno para reducir la carga biológica. El tratamiento de la al menos una matriz de tejido que contiene colágeno para reducir la carga biológica puede comprender irradiar el producto de tejido.

Descripción de los dibujos

30 Las Figuras 1A-1H son dibujos en blanco y negro que ilustran los resultados de la tinción inmunohistoquímica de restos alfa-gal con dermis acelular porcina sin tratar (sin usar enzima para eliminar alfa-gal) y muestras de dermis acelular porcina tratadas con bromelina, alcalasa, y tripsina, cada una con y sin tratamiento con alfa-galactosidasa, de acuerdo con los métodos del Ejemplo 1.

35 La Figura 2 ilustra los resultados de las mediciones por ELISA de inhibición del porcentaje de alfa-gal que queda en las matrices dérmicas acelulares como controles sin tratar, y las matrices dérmicas acelulares tratadas con diversas enzimas.

Descripción de ciertas modalidades ilustrativas

40 La invención se define en las reivindicaciones. Ahora se hará referencia en detalle a ciertas modalidades ilustrativas de acuerdo con la presente descripción, de las cuales ciertos ejemplos se ilustran en los dibujos acompañantes.

45 Los encabezados de sección usados en la presente descripción son solo para fines organizativos y no deben interpretarse como limitantes del tema descrito.

50 En esta solicitud, el uso del singular incluye el plural a menos que se indique específicamente de otra manera. También en esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique de otra manera. Además, el uso del término "que incluye", así como también otras formas, tales como "incluye" y "se incluye", no son limitantes. Se entenderá que cualquier intervalo descrito en la presente descripción incluye los puntos extremos y todos los valores entre los puntos extremos.

55 En la presente descripción se describen métodos para preparar productos de tejidos que tienen inmunogenicidad reducida cuando se implantan en seres humanos o primates no humanos mediante la eliminación de algunos o todos los epítopos alfa-gal. Pueden usarse varios tejidos humanos o de otros animales y diversos métodos para preparar los productos de tejido. Por ejemplo, las composiciones pueden prepararse mediante la selección de un tejido porcino; opcionalmente descelularizar el tejido para producir una matriz de tejido que contiene colágeno; y exponer el tejido a una o más proteasas, por ejemplo, alcalasa, bromelina, tripsina, y/o dispasa, durante un período de tiempo y a una concentración suficiente para eliminar una cantidad deseada de restos alfa-gal. En algunos aspectos de la descripción, la eliminación de restos alfa-gal puede medirse y/o confirmarse después de la exposición a la proteasa. En ciertos aspectos de la descripción, la enzima puede incluir una enzima que no es una alfa-galactosidasa, es decir, que no es específica para la escisión de alfa-galactosa.

60 En diversas modalidades, los productos de tejido pueden comprender tejido intacto, matrices de tejido descelularizadas parcialmente o completamente, y/o tejidos descelularizados que se sembraron con una o más células. En algunas modalidades, la eliminación de algunos o todos los epítopos de alfa-gal puede confirmarse, por ejemplo, mediante medición directa y comparación de la concentración de alfa-gal en la superficie de una muestra

del producto de tejido tratado con proteasa frente a la concentración en un tejido sin tratar. En algunas modalidades, la eliminación puede confirmarse mediante la comparación de la respuesta inmunitaria y/o inflamatoria en el tejido tratado con proteasa frente a la respuesta en un tejido no tratado.

- 5 Como se usa en la presente descripción, el término "matriz de tejido" se refiere a una estructura tridimensional de colágeno y proteína que forma una red de fibras que tienen una forma y orientación similar a la forma y orientación de la red de colágeno y proteína que se encuentra en un tejido de origen natural. Las células del tejido natural pueden eliminarse para proporcionar una matriz de tejido acelular.
- 10 De acuerdo con diversas modalidades, los materiales y métodos proporcionados en la presente descripción pueden usarse para fabricar un producto de tejido que sea un implante biocompatible (por ejemplo, un injerto de tejido biocompatible). Como se usa en la presente descripción, un implante "biocompatible" es uno que tiene la capacidad de soportar la migración y proliferación de células nativas desde el tejido circundante a un producto de tejido implantado y/o implantarse sin inducir una respuesta inmune sustancial. Como se usa en la presente descripción, los términos "células nativas" y "tejido nativo" significan las células o tejido presentes en el órgano o tejido receptor antes de la implantación de un producto de tejido, o las células o tejido producido por el animal huésped después de la implantación. Los implantes biocompatibles pueden soportar la actividad celular nativa necesaria para la regeneración, reparación, curación, o tratamiento de tejidos y pueden no provocar una respuesta inmune sustancial que evite tal actividad celular. Como se usa en la presente descripción, una "respuesta inmune sustancial" es una que previene la regeneración, reparación, curación o tratamiento parcial o completo del tejido.

Los productos de tejido producidos de acuerdo con los métodos discutidos en la presente descripción pueden usarse, en ciertas modalidades, para regenerar, reparar, reemplazar, curar, aumentar, reforzar y/o tratar tejidos nativos que se dañaron o perdieron debido a diversas enfermedades y/o daño estructural (por ejemplo, por traumatismo, cirugía, atrofia y/o desgaste y degeneración a largo plazo). Además, las composiciones de la presente descripción pueden usarse, en ciertas modalidades, con fines cosméticos para reparar o alterar la apariencia o sensación de un tejido nativo. Los productos de tejido fabricados mediante el uso de los métodos discutidos en la presente descripción pueden tener respuestas inflamatorias reducidas u otras respuestas y, por lo tanto, pueden reducir la posibilidad de rechazo del implante (por ejemplo, debido a una respuesta inmune a epítopos xenogénicos como alfa-gal en un producto de tejido). Por ejemplo, un producto de tejido sustancialmente libre de restos alfa-gal puede usarse como injerto de tejido, lo que reduce de esta manera el riesgo de rechazo o una respuesta inmunitaria inflamatoria al injerto.

Eliminación de epítopos alfa-1,3-galactosa

35 En varios aspectos de la descripción, los epítopos alfa-gal pueden eliminarse de un producto de tejido antes del trasplante mediante la exposición del producto de tejido a una proteasa como alcalasa, bromelina, tripsina, o dispasa a una concentración suficiente y durante un período de tiempo suficiente para eliminar una cantidad deseada de epítopos alfa-gal. En algunos aspectos de la descripción, la enzima proteasa se selecciona por su capacidad para eliminar alfa-gal mientras minimiza el daño a la matriz extracelular del tejido. En algunos aspectos de la descripción, los métodos de la presente descripción se usan para eliminar alfa-gal sin dañar la matriz extracelular del tejido.

40 En diversas modalidades, además, las enzimas, las concentraciones de enzimas, y los tiempos de tratamiento se seleccionan para controlar otras propiedades mecánicas o biológicas. Por ejemplo, las enzimas y las condiciones de tratamiento pueden seleccionarse para producir un producto de tejido con propiedades mecánicas o biológicas deseables, como se describe en las solicitudes de Estados Unidos en trámite junto con la presente números 13/457,791 y 14/019,274.

45 En diversas modalidades, los métodos descritos en la presente descripción pueden usarse para eliminar una cantidad suficiente de restos alfa-gal de manera que el producto de tejido no induzca una respuesta inmune sustancial después de la implantación. En algunas modalidades, los métodos descritos en la presente descripción pueden usarse para eliminar sustancialmente todos los epítopos alfabgal en un producto de tejido (por ejemplo, al menos aproximadamente 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 99,9 o 99,99 % o 100 %, o cualquier porcentaje intermedio). En algunas modalidades, se elimina un porcentaje suficiente de epítopos alfa-gal de manera tal que los productos de tejido tengan al menos una reducción del 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 % en la inflamación o respuesta inmune después de la implantación, en comparación con la respuesta a un tejido no tratado (o cualquier porcentaje intermedio). En algunas modalidades, se elimina un porcentaje suficiente de epítopos alfa-gal de manera tal que los productos de tejido tengan al menos una reducción de aproximadamente 2, 3, 4, 5, o más veces en la inflamación o la respuesta inmune, en comparación con la respuesta a un tejido no tratado.

50 Los productos de tejido descritos en la presente descripción pueden comprender cualquier tejido adecuado para la implantación a partir de un animal (por ejemplo, cerdos u otros mamíferos no primates) después de la eliminación de los epítopos alfa-gal. Puede usarse tejido de uno o más animales diferentes en los productos de tejido. El tejido puede ser, por ejemplo, uno o más de fascia, tejido pericárdico, duramadre, tejido adiposo, tejido del cordón umbilical, tejido placentario, tejido de la válvula cardíaca, tejido del ligamento, tejido del tendón, tejido arterial, tejido venoso, tejido conectivo neural, tejido de vejiga urinaria, tejido de uréter, piel, tejido dérmico, tejido cardíaco, tejido

5 pulmonar, tejido hepático, y tejido intestinal, entre otras fuentes de tejido ilustrativas. En algunas modalidades, el tejido puede ser tejido acelular, parcialmente descelularizado, y/o descelularizado que se repobló con células exógenas, siempre que el tejido retenga al menos parte del armazón de la matriz extracelular que se encuentra en el tejido nativo antes de la descelularización. Si se usa un tejido descelularizado, puede descelularizarse antes, al mismo tiempo, o después del tratamiento para eliminar los epítopos alfa-gal.

10 En algunas modalidades, el tejido en un producto de tejido se proporciona mediante su recolección a partir de una fuente de tejido de un donante. En algunas modalidades, el tejido recolectado proporciona una estructura de armazón extracelular porosa a la que las células del tejido nativo circundante pueden migrar y proliferar después de la implantación de un producto de tejido en un sitio huésped. En algunas modalidades, el tejido se descelulariza parcialmente o completamente. Alternativamente, puede usarse cualquier otra matriz de tejido descelularizada adecuada. Por ejemplo, Badylak y otros describen una serie de materiales de andamiaje biológicos, y los métodos de la presente descripción pueden usarse para producir productos de tejidos mediante el uso de cualquiera de esos materiales, o cualquier otro material similar. Badylak y otros, "Extracellular Matrix as a Biological Scaffold Material: 15 Structure and Function," *Acta Biomaterialia* (2008), doi:10.1016/j.actbio.2008.09.013.

20 En varios aspectos de la descripción, los epítopos alfa-gal pueden eliminarse de un tejido en un producto de tejido mediante la exposición a una enzima proteasa, tal como alcalasa, bromelina, tripsina, o dispasa en una concentración suficiente y durante un período de tiempo suficiente para eliminar un porcentaje deseado de epítopos. Por ejemplo, una muestra de tejido puede exponerse a alcalasa y/o tripsina en una concentración que está en el intervalo de aproximadamente 0,0001 % a aproximadamente 0,1 % (por ejemplo, aproximadamente 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, o 0,1 %, o cualquier porcentaje intermedio). En algunas modalidades, el tejido puede exponerse a de aproximadamente 0,0001 % a 25 aproximadamente 0,1 % de alcalasa y/o tripsina durante un período de tiempo que está en el intervalo de aproximadamente 0,5 horas a aproximadamente 24 horas (por ejemplo, aproximadamente 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o 24 horas, o cualquier período de tiempo intermedio). En algunos aspectos de la descripción, una concentración más alta de enzima se empareja con un tiempo de incubación más corto, o una concentración más baja con un tiempo de incubación más largo. En algunas modalidades, la exposición a alcalasa y/o tripsina puede ser a una temperatura que está en el intervalo entre aproximadamente 15 y 40 °C.

30 30 En otro ejemplo, una muestra de tejido puede exponerse a bromelina y/o dispasa a una concentración que está en el intervalo de aproximadamente 10 unidades/litro a aproximadamente 200 unidades/litro (por ejemplo, aproximadamente 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, o 200 unidades/litro, o cualquier concentración intermedia). En algunos aspectos de la descripción, el tejido puede exponerse a de aproximadamente 10 unidades/litro a 35 aproximadamente 200 unidades/litro de bromelina y/o dispasa durante un período de tiempo que está en el intervalo de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 24 horas (por ejemplo, aproximadamente 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, o 24 horas, o cualquier período de tiempo intermedio). En algunos aspectos de la descripción, una mayor concentración de enzima se empareja con un tiempo de incubación más corto y una concentración más baja con un tiempo de incubación más largo. En algunos aspectos de la descripción, la exposición a bromelina y/o dispasa puede ser a una temperatura que está en el intervalo de aproximadamente 15 a 40 °C.

40 45 En varios aspectos de la descripción, una ventaja de eliminar los epítopos alfa-gal mediante la exposición de un tejido a una o más de alcalasa, bromelina, tripsina, y dispasa es que estas enzimas pueden servir, demás, para alterar las propiedades mecánicas del tejido, por ejemplo, para proporcionar un tejido que presente un nivel deseado de flexibilidad y/o blandura (tal como la blandura y la flexibilidad de un tejido humano nativo que se reemplaza por un xenoinjerto). Por lo tanto, el uso de estas enzimas puede evitar o reducir la necesidad de etapas de tratamiento separados para eliminar alfa-gal y alterar las propiedades mecánicas del producto de tejido, es tan deseable. Esto 50 puede reducir el tiempo de procesamiento para la preparación de un producto de tejido y/o reducir el riesgo de daño del tejido durante el procesamiento y los procedimientos de lavado posteriores. En algunos aspectos de la descripción, la concentración y/o la duración de la exposición a uno o más de alcalasa, bromelina, tripsina, y/o dispasa se selecciona para eliminar sustancialmente los epítopos alfa-gal y producir un producto de tejido que tenga un grado deseado de flexibilidad y/o suavidad.

55 55 En ciertos aspectos de la descripción, un tejido expuesto a uno o más de alcalasa, bromelina, tripsina, y/o dispasa puede exponerse a uno o más tratamientos enzimáticos o químicos adicionales para eliminar más epítopos alfa-gal u otros antígenos indeseables, por ejemplo, otros antígenos que normalmente no se expresan por el animal receptor y que, por lo tanto, es probable que conduzcan a una respuesta inmunitaria y/o al rechazo del producto de tejido implantado. Por ejemplo, en ciertas modalidades, el tejido puede tratarse con alfa-galactosidasa para eliminar más 60 restos de alfa-galactosa (a-gal). En otras modalidades, puede usarse cualquier tampón y concentración de alfa-galactosidasa adecuados, siempre que se logre una eliminación suficiente del antígeno. En adición, ciertos métodos ilustrativos de procesamiento de tejidos para reducir o eliminar restos de alfa-1,3-galactosa se describen en Xu y otros, *Tissue Engineering*, vol. 15, 1-13 (2009).

65 65 La presencia o ausencia de alfa-gal en los tejidos tratados puede evaluarse de varias formas. Por ejemplo, en diversas modalidades, puede usarse tinción inmunohistoquímica o inmunoensayos tales como ensayos ELISA. Tal

tinción puede incluir, por ejemplo, la unión de un anticuerpo específico de alfa-gal a una muestra de tejido y hacer que se forme una molécula informadora (por ejemplo, mediante la unión de una enzima al anticuerpo mediante el uso de uno o más anticuerpos adicionales).

5 Productos de tejido descelularizado

En varias modalidades, un producto de tejido puede comprender un tejido intacto o descelularizado de un mamífero no primate que expresa epítopos alfa-gal y del cual se han eliminado los epítopos alfa-gal exponiendo el tejido a una o más enzimas proteasas, tales como alcalasa, bromelina, tripsina y/o dispasa. En algunas modalidades, el tejido 10 puede descelularizarse parcialmente o completamente, pero conserva al menos algunos componentes de la matriz extracelular en los que las células nativas del tejido circundante un producto de tejido implantado puede migrar y proliferar, lo que mejora de esta manera la velocidad o el nivel general de reparación, regeneración, curación, o tratamiento del tejido nativo. La descelularización puede realizarse antes, al mismo tiempo, y/o después de exponer el tejido a una o más enzimas proteasas, tales como alcalasa, bromelina, tripsina y/o dispasa. En una modalidad, la descelularización se realiza después de la exposición a una o más proteasas.

En algunas modalidades, un producto de tejido puede derivarse de cualquier tejido que sea adecuado para la descelularización y la implantación posterior. Los tejidos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, hueso, piel, tejido adiposo, dermis, intestino, vejiga urinaria, tendón, ligamento, músculo, fascia, tejido neurológico, vaso, hígado, 20 corazón, pulmón, riñón, cartílago y/o cualquier otro tejido adecuado. En determinadas modalidades, el producto de tejido puede incluir un tejido blando descelularizado. Por ejemplo, el producto de tejido puede incluir dermis parcialmente o completamente descelularizada. En otras modalidades, el producto de tejido puede comprender submucosa del intestino delgado parcialmente o completamente descelularizada.

25 Métodos ejemplares para descelularizar tejido se describen en la patente de Estados Unidos núm. 6,933,326 y la solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2010/0272782. En varias modalidades, las etapas generales implicadas en la producción de una matriz de tejido descelularizada parcialmente o completamente incluyen recolectar tejido de una fuente donante y eliminar células en condiciones que preservan la función biológica y estructural. En determinadas modalidades, el tejido recolectado puede lavarse para eliminar cualquier crioprotector residual y/u 30 otros contaminantes. Las soluciones usadas para el lavado pueden ser cualquier solución fisiológicamente compatible. Los ejemplos de soluciones de lavado adecuadas incluyen agua destilada, solución salina tamponada con fosfato (PBS), o cualquier otra solución salina biocompatible.

35 En determinadas modalidades, el proceso de descelularización incluye un tratamiento químico para estabilizar el tejido recolectado a fin de evitar la degradación bioquímica y estructural antes, durante, o después de la eliminación de células. En diversas modalidades, la solución estabilizadora detiene y previene la degradación osmótica, hipóxica, autolítica y/o proteolítica, protege contra la contaminación microbiana; y/o reduce el daño mecánico que 40 puede ocurrir durante la descelularización de tejidos que contienen, por ejemplo, componentes del músculo liso (por ejemplo, vasos sanguíneos). La solución estabilizadora puede contener un tampón apropiado, uno o más antioxidantes, uno o más agentes oncolíticos, uno o más antibióticos, uno o más inhibidores de proteasa, y/o uno o más relajantes del músculo liso.

45 En varias modalidades, el tejido se coloca en una solución de descelularización para eliminar algunas o todas las células viables (por ejemplo, células epiteliales, células endoteliales, células de músculo liso, y fibroblastos, etc.) de la matriz extracelular sin dañar la integridad biológica y/o estructural de la matriz extracelular. La solución de descelularización puede contener un tampón apropiado, sal, un antibiótico, uno o más detergentes (por ejemplo, TRITON X-100™, dodecil sulfato de sodio, desoxicolato de sodio, monooleato de polioxieteno sorbitán (20), etc.), uno o más agentes para evitar la reticulación, uno o más inhibidores de proteasa, y/o una o más enzimas.

50 En determinadas modalidades, la descelularización elimina completamente o sustancialmente todas las células normalmente presentes en el tejido del que se deriva el producto de tejido. Como se usa en la presente descripción, "sustancialmente libre de todas las células" significa que el producto de tejido contiene menos del 20 %, 10 %, 5 %, 1 %, 0,1 %, 0,01 %, 0,001 % o 0,0001 % (o cualquier porcentaje intermedio) de las células que normalmente crecen dentro de la matriz acelular del tejido antes de la descelularización.

55 Los productos de tejido, como se describe en la presente descripción, pueden comprender uno o más elementos que comprenden tejidos parcialmente o completamente descelularizados que tienen una matriz de tejido acelular y/o tejidos intactos sin descelularizar. En una modalidad, el producto de tejido comprende elementos que tienen una matriz de tejido dérmico acelular. En determinadas modalidades, el tejido descelularizado se selecciona de uno o más de fascia, tejido pericárdico, dura, tejido del cordón umbilical, tejido placentario, tejido de la válvula cardíaca, tejido del ligamento, tejido del tendón, tejido arterial, tejido venoso, tejido conectivo neural, tejido de vejiga urinaria, tejido del uréter, piel, tejido dérmico, tejido cardíaco, tejido pulmonar, tejido hepático, y tejido intestinal.

60 En determinadas modalidades, después de la descelularización de un tejido en un producto de tejido, pueden sembrarse opcionalmente células histocompatibles/viables en la matriz de tejido acelular. En algunas modalidades, pueden adicionarse 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 la migración de células nativas del tejido circundante hacia la matriz del tejido o por infusión o inyección de células histocompatibles obtenidas del receptor o de otro donante hacia la matriz de tejido in situ. Pueden usarse varios tipos de células, que incluyen las células madre, como las células madre embrionarias y/o las células madre adultas. Además, puede usarse cualquier otra célula viable que sea histocompatible con el paciente en el que se implantan. En algunas modalidades, las células histocompatibles son células de mamífero. Estas células pueden promover la migración, proliferación, y/o vascularización de tejido nativo. En diversas modalidades, las células pueden aplicarse directamente a la matriz de tejido justo antes o después de la implantación.
- 10 En algunas modalidades, un producto de tejido puede tratarse para reducir una carga biológica (es decir, para reducir el número de microorganismos que crecen en el tejido). En algunas modalidades, el producto de tejido se trata de manera que carece sustancialmente de toda la carga biológica (es decir, el producto de tejido es aséptico o estéril). Como se usa en la presente descripción, "sustancialmente toda la carga biológica" significa que la concentración de microorganismos que crecen en el producto de tejido es menos del 1 %, 0,1 %, 0,01 %, 0,001 %, o 0,0001 % de la que crecía antes del tratamiento de la carga biológica, o cualquier porcentaje intermedio. Los expertos en la técnica conocen métodos adecuados de reducción de la carga biológica y pueden incluir exponer el producto de tejido a radiación. La irradiación puede reducir o eliminar sustancialmente la carga biológica. Las formas adecuadas de radiación pueden incluir radiación gamma, radiación de haz electrónico, y radiación de rayos X. Otros métodos de irradiación se describen en la solicitud de Estados Unidos núm. 2010/0272782.
- 15 20 En algunas modalidades, pueden adicionarse uno o más agentes adicionales al producto de tejido. En algunas modalidades, el agente adicional puede comprender un agente antiinflamatorio, un analgésico, o cualquier otro agente terapéutico o beneficioso deseado. En determinadas modalidades, el agente adicional puede comprender al menos un factor de crecimiento o señalización adicionado (por ejemplo, un factor de crecimiento celular, un factor angiogénico, un factor de diferenciación, una citocina, una hormona, y/o una quimiocina). Estos agentes adicionales pueden promover la migración, proliferación, y/o vascularización de tejido nativo. En algunas modalidades, el factor de crecimiento o señalización se codifica por una secuencia de ácido nucleico contenida dentro de un vector de expresión. Preferentemente, el vector de expresión está en una o más de las células viables que pueden adicionarse, opcionalmente, al producto de tejido. Como se usa en la presente descripción, el término "vector de expresión" se refiere a cualquier construcción de ácido nucleico que es capaz de absorberse por una célula, contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína deseada, y contiene las otras secuencias de ácido nucleico necesarias (por ejemplo, promotores, potenciadores, codón de terminación, etc.) para asegurar al menos una expresión mínima de la proteína deseada por la célula.
- 25 30 35 40 Los productos de tejido, como se describe anteriormente, pueden proporcionarse envasados, congelados, liofilizados, y/o deshidratados. En determinadas modalidades, los productos de tejido envasados son estériles. Por ejemplo, un kit puede comprender un producto de tejido hidratado, congelado, liofilizado, y/o deshidratado e instrucciones para preparar y/o usar los productos de tejido.
- Ejemplos**
- Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar, y de ningún modo limitan, la presente descripción.
- 45 Tratamiento enzimático de pADM
- La piel de cerdo se recolectó de un matadero y se dividió mediante la eliminación física de la epidermis y la grasa subcutánea. El tejido dérmico restante se descontaminó con soluciones antibióticas. Despues de la descontaminación, el tejido se procesó en condiciones asépticas.
- 50 El tejido dérmico se trató con una de las enzimas (bromelina, alcalasa, o tripsina) durante el tiempo especificado. Tanto para la alcalasa como para la tripsina, las concentraciones usadas estuvieron en el intervalo entre 0,1 % y 0,00039 % y el tiempo de tratamiento usado estuvo en el intervalo entre 1 hora y toda la noche (probablemente 16-18 horas). Las temperaturas usadas fueron temperatura ambiente y 37 °C. Para la bromelina, las concentraciones usadas estuvieron en el intervalo de 25 unidades/litro a 200 unidades/litro y el tratamiento usado estuvo en el intervalo de 6 horas a toda la noche (probablemente 16-18 horas). Las temperaturas usadas fueron temperatura ambiente y 37 °C. Para cada una de las tres enzimas (alcalasa, bromelina y tripsina), es probable que funcionen, además, concentraciones más bajas y/o tiempos de tratamiento más cortos, pero aún no se probaron. Generalmente, cuanto menor sea la concentración, mayor será el tiempo de tratamiento para que la(s) enzima(s) tenga(n) un efecto en los tejidos. El tratamiento a 37 °C puede mejorar, además, la velocidad y/o actividad del tratamiento enzimático, de manera tal que pueden usarse concentraciones más bajas y/o tiempos de tratamiento más cortos.
- 60 65 Despues el tejido se descelularizó con detergentes para eliminar las células viables. Los desechos celulares y los productos químicos residuales se eliminaron mediante lavado en PBS. La matriz dérmica acelular porcina resultante (pADM) se almacenó a temperatura ambiente hasta que estuvo lista para su uso.

Procedimiento de detección de alfa-gal

La presencia de alfa-gal puede detectarse mediante el uso de una serie de anticuerpos y reactivos de detección colorimétrica. Los tejidos se conservan primero en una solución de sacarosa y después se incrustan en un medio de inclusión (OCT) y se congelan en nitrógeno líquido.

5 Los bloques congelados que contenían los tejidos se cortaron después en secciones delgadas (micras) mediante el uso de un micrótomo de criostato y se colocaron en un portaobjetos de microscopio. Los portaobjetos que contenían los tejidos se bloquearon con una solución para evitar la unión no específica y después se incubaron con un anticuerpo primario, que es un anticuerpo biotinilado que se une específicamente a los residuos alfa-gal. Después de lavar el primer anticuerpo, se adicionó a los portaobjetos un 10 segundo anticuerpo (estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante). La estreptavidina del segundo anticuerpo se une a la biotina del anticuerpo primario. Después de un período de incubación, el segundo anticuerpo también se lavó después de lo cual se adicionó un reactivo de detección (DAB) a los portaobjetos. DAB deposita una mancha marrón en el portaobjetos en presencia de peroxidasa de rábano picante.

15 Las Figuras 1A-1H incluyen dibujos en blanco y negro representativos de la tinción inmunohistoquímica para restos alfa-gal con dermis acelular porcina sin tratar (sin enzima usada para eliminar alfa-gal) (Figura 1A), de muestras de dermis acelular porcina tratadas con bromelina (Figuras 1E-1F), alcalasa (Figuras 1C-D), y tripsina (Figuras 1G-H), cada una con y sin tratamiento con alfa-galactosidasa, de acuerdo con los métodos del Ejemplo 1. Como se muestra, las muestras tratadas con bromelina, tripsina, y alcalasa no muestran tinción para restos alfa-gal.

20 Ensayo cuantitativo ELISA de inhibición

La evaluación cuantitativa del contenido de α -Gal se midió mediante el uso de un ensayo ELISA de inhibición. Se trituraron varias matrices dérmicas acelulares (ADM) y se incubaron con anticuerpo anti- α -Gal. Después del período 25 de incubación, el sobrenadante que contenía cualquier anticuerpo no unido se transfirió a una placa de 96 pocillos recubierta con α -Gal. La cantidad de anticuerpo no unido presente en el sobrenadante, que posteriormente se unió a la placa de pocillos, se detectó mediante el uso de un anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina seguido de sustrato de detección de p-nitrofenil fosfato.

30 Las ADM que contienen altos niveles de α -Gal capturaron la mayoría, si no todos, los anticuerpos anti- α -Gal, y dejaron muy poco en el sobrenadante y, por lo tanto, produjeron una lectura baja en la placa de pocillos. Por el contrario, las ADM que contienen niveles bajos de α -Gal solo capturan niveles bajos, si los hay, de anticuerpos anti- α -Gal, dejando la mayoría de los anticuerpos en el sobrenadante. Por tanto, los sobrenadantes de estas muestras 35 produjeron lecturas muy altas en la placa de pocillos.

35 Las lecturas de la placa de pocillos se normalizaron a controles tanto positivos como negativos. Dado que la α -Gal está ausente en los tejidos humanos, pero está presente en los tejidos porcinos, se usaron matrices dérmicas acelulares humanas (hADM) y matrices dérmicas acelulares porcinas (pADM) sin tratamiento con α -galactosidasa como control negativo y controles positivos, respectivamente. El tratamiento de pADM con α -galactosidasa redujo el 40 contenido de α -Gal a aproximadamente un 30 % de la pADM sin tratar. El tratamiento con enzimas (alcalasa o tripsina) de pADM, en ausencia de α -galactosidasa, redujo el contenido de α -Gal a niveles comparables o inferiores a los del tratamiento con α -galactosidasa (Figura 3).

45 Los ejemplos anteriores pretenden ilustrar y de ningún modo limitar la presente descripción. Otras modalidades de los dispositivos y métodos descritos serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la consideración de la descripción y la práctica de los dispositivos y métodos descritos en la presente descripción.

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar un producto de tejido, que comprende seleccionar al menos una matriz de tejido que contiene colágeno contenida dentro de un tejido celular y que contiene restos de galactosa alfa-1,3-galactosa; y poner en contacto la al menos una matriz de tejido con alcalasa en condiciones suficientes para eliminar restos de galactosa alfa-1,3-galactosa del tejido.
2. El método de la reivindicación 1, en donde el método comprende, además, descelularizar el tejido celular.
3. El método de la reivindicación 2, en donde la matriz de tejido se descelulariza completamente.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la alfa-galactosa se elimina sustancialmente o completamente de la matriz de tejido que contiene colágeno.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la alcalasa elimina los restos de galactosa alfa-1,3-galactosa sin dañar al menos una matriz de tejido.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende, además, realizar un ensayo para determinar si se han eliminado los restos de galactosa alfa-1,3-galactosa de la al menos matriz de tejido que contiene colágeno; en donde opcionalmente el ensayo comprende medir una concentración de restos de galactosa alfa-1,3-galactosa;
 - 20 opcionalmente en donde el ensayo comprende un ensayo histoquímico;
 - opcionalmente en donde el ensayo comprende un inmunoensayo.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la alcalasa se usa a una concentración que está en el intervalo de 0,0001 % a 0,1 % y durante un período de tiempo que está en el intervalo de 0,5 horas a 24 horas.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende, además, poner en contacto el tejido con alfa-galactosidasa.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la al menos una matriz de tejido que contiene colágeno comprende una matriz de tejido de al menos uno de hueso, piel, dermis de tejido adiposo, intestino, vejiga urinaria, tendón, ligamento, músculo, fascia, tejido vascular, neurológico, de vasos, hígado, corazón, pulmón, riñón y cartílago;
 - 35 opcionalmente en donde se usa tejido de uno o más animales o fuentes de tejido diferentes;
 - opcionalmente en donde la al menos una matriz de tejido que contiene colágeno es una matriz de tejido porcino;
 - opcionalmente en donde la al menos una matriz de tejido que contiene colágeno consiste en una matriz de tejido dérmico acelular porcino.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende, además, adicionar una o más células viables e histocompatibles al producto de tejido;
 - 45 opcionalmente en donde la una o más células son células de mamífero;
 - opcionalmente en donde la una o más células son células madre.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende, además, tratar la al menos una matriz de tejido que contiene colágeno para reducir la carga biológica;
 - 50 opcionalmente en donde tratar la al menos una matriz de tejido que contiene colágeno para reducir la carga biológica comprende irradiar el producto de tejido.
12. El uso de alcalasa, en un método para eliminar restos de galactosa alfa-1,3-galactosa de al menos una matriz de tejido que contiene colágeno contenida dentro de un tejido celular y que contiene restos de galactosa alfa-1,3-galactosa, el método comprende; poner en contacto la al menos una matriz de tejido con alcalasa en condiciones suficientes para eliminar restos de galactosa alfa-1,3-galactosa del tejido.



Figura 1A

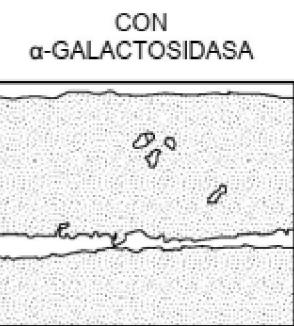


Figura 1B

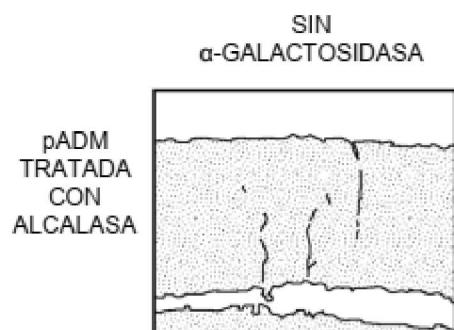


Figura 1C

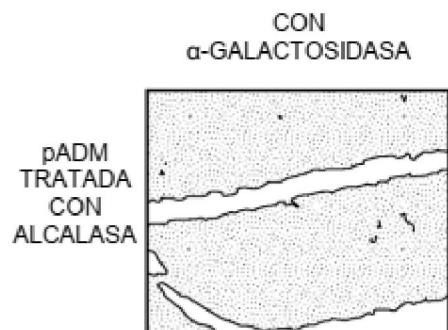


Figura 1D

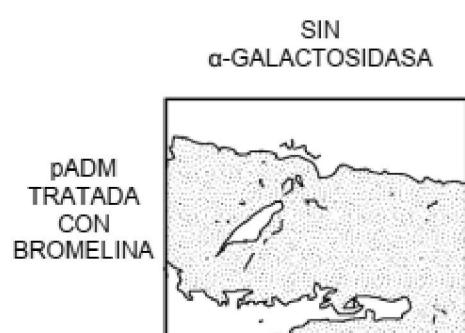


Figura 1E

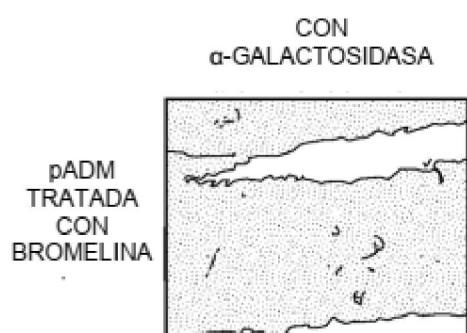


Figura 1F

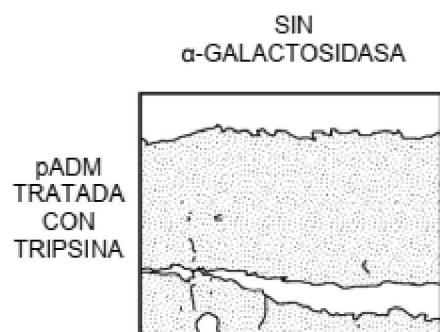


Figura 1G

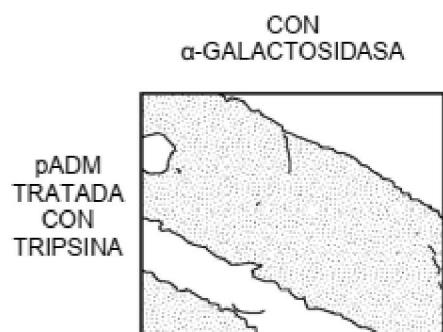


Figura 1H

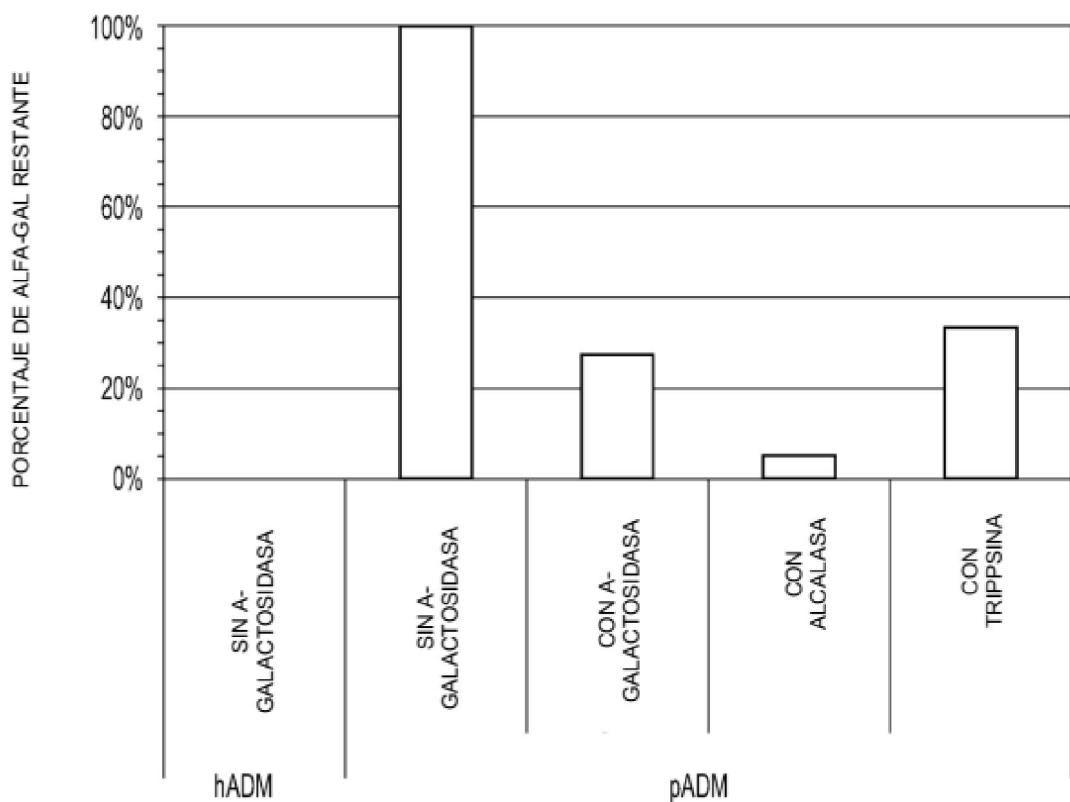


Figura 2