

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 860 464**

51 Int. Cl.:

A61L 27/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2012 E 18210458 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.11.2020 EP 3501558**

54 Título: **Productos de tejido fluidizable**

30 Prioridad:

20.12.2011 US 201161577729 P

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

05.10.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HAYZLETT, MARK;
MUNOZ, IVIS;
KABARIA, NIMESH y
CZECZUGA, JOSHUA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 860 464 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

Productos de tejido fluidizable

5 La presente divulgación se refiere a productos de tejido, y más en particular, a productos de tejido particulados para su uso como materiales de relleno de tejidos.

10 Se han producido diversos productos de tejido para reemplazar, aumentar o tratar los defectos de los tejidos. Por ejemplo, para reemplazar o aumentar los defectos de los tejidos blandos, se pueden usar matrices dérmicas acelulares particuladas que forman una pasta o material similar a la masilla. Dichos productos incluyen, por ejemplo, CYMETRA®, que es una matriz de tejido acelular dérmico fabricada por LIFECELL® Corporation (Branchburg, NJ). El documento US2005/159822 A1 describe un método de procesamiento de una matriz de tejido acelular para obtener una matriz de tejido acelular particulada que incluye las etapas de: criofracturar las tiras secas de la matriz de tejido acelular a temperaturas criogénicas; y separar las partículas resultantes por tamaño. Las partículas tienen un tamaño de aproximadamente 1 micra a aproximadamente 900 micras. Las aplicaciones potenciales de los materiales de matriz de tejido acelular particulada pueden incluir: aplicaciones dermatológicas como la revisión de cicatrices de acné, la reposición de la dermis perdida por enfermedad o accidente; aplicaciones urológicas como el alivio de la incontinencia, aplicaciones quirúrgicas reconstructivas para sustituir la pérdida de tejido por la cirugía del cáncer u otros procedimientos quirúrgicos, etc.

20 Aunque son adecuadas para determinadas aplicaciones, son deseables mejoras adicionales en la capacidad de los productos de tejido para el tratamiento de tejidos blandos o duros. La presente divulgación describe productos de tejido mejorados producidos a partir de matrices de tejido particuladas.

25 Resumen

De acuerdo con ciertos modos de realización, se proporciona un producto de tejido. El producto incluye una pluralidad de partículas de matriz de tejido secas, sustancialmente esféricas, que tienen un diámetro entre 1 mm y 5 mm. Las partículas de matriz de tejido comprenden cada una pluralidad de fragmentos de matriz de tejido que tienen una longitud de entre aproximadamente 5 μm y 300 μm , en la que los fragmentos de matriz de tejido tienen extremos deshilachados que se entrelazan entre sí para unir los fragmentos entre sí, para formar se forman en partículas de matriz de tejido.

35 En el presente documento se describe, pero no se reivindica, se proporciona un procedimiento para producir una composición para el tratamiento de tejidos. El procedimiento puede incluir seleccionar una matriz de tejido y tratar la matriz de tejido para producir fragmentos que tengan una longitud de entre aproximadamente 5 μm y 300 μm . El procedimiento puede además incluir formar los fragmentos en una pluralidad de partículas que tengan una dimensión más larga de entre aproximadamente 1 mm y aproximadamente 5 mm; y tratar las partículas para unir entre sí los fragmentos que forman cada partícula. En algunos modos de realización, la presente divulgación incluye productos de tejido producidos de acuerdo con los procedimientos divulgados.

45 En el presente documento se describe, pero no se reivindica, se proporciona un producto de tejido. El producto de tejido puede incluir una pluralidad de partículas de matriz de tejido secas que forman una masa fluidizable que se puede verter en un sitio de tejido y fluirá para rellenar y ajustarse a un sitio de tejido. Las partículas son sustancialmente esféricas y tienen un radio entre 1 mm y 5 mm. Las partículas de matriz de tejido comprenden cada una pluralidad de fragmentos de matriz de tejido que tienen una longitud de entre aproximadamente 5 μm y 300 μm , y tienen extremos deshilachados que se entrelazan entre sí para unir los fragmentos entre sí para formar las partículas de matriz de tejido.

50 Descripción de los dibujos

La fig. 1 ilustra un procedimiento para producir un producto de tejido de acuerdo con diversos modos de realización.

55 Descripción de determinados modos de realización ejemplares

Ahora se hará referencia en detalle a determinados modos de realización ejemplares de acuerdo con la presente divulgación, ilustrándose determinados ejemplos de las mismas en los dibujos adjuntos. Siempre que sea posible, se utilizarán los mismos números de referencia en todos los dibujos para referirse a partes iguales o similares.

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

65

Los encabezados de sección usados en el presente documento son solo para propósitos organizativos y no deben interpretarse como limitantes de la materia objeto descrita. Todos los documentos, o partes de documentos, citados en esta solicitud, incluyendo pero sin limitarse a patentes, solicitudes de patentes, artículos, libros y tratados, se incorporan expresamente por referencia en su totalidad para cualquier propósito.

Como se usa en el presente documento, "producto de tejido" se referirá a cualquier tejido humano o animal que contenga proteínas de la matriz extracelular. Los "productos de tejido" pueden incluir matrices de tejidos intactos, matrices de tejido acelular o parcialmente descelularizado, matrices de tejido descelularizado que se han repoblado con células exógenas y/o tejidos celulares que se han procesado para cambiar la orientación de al menos algunas de las fibras de colágeno dentro de la matriz extracelular del tejido.

Diversos productos de tejido están disponibles para el tratamiento de tejidos duros y blandos. Dichos productos de tejido pueden incluir tejidos procesados, que se han tratado para eliminar algunos o todos los componentes celulares y/u otros materiales (por ejemplo, antígenos y lípidos). Dichos productos de tejido se pueden usar para el tratamiento, reparación, regeneración y/o aumento de una variedad de tejidos diferentes. Por ejemplo, las matrices de tejido acelular se pueden usar para reemplazar el tejido blando perdido o dañado debido, por ejemplo, a cirugía, traumatismo, enfermedad y/o atrofia.

Las matrices de tejido actuales u otros materiales de reemplazo o andamiaje de tejidos (por ejemplo, colágeno procesado o materiales sintéticos) están disponibles en una variedad de formas diferentes. Por ejemplo, STRATTICE™ y ALLODERM® (LIFECCELL® Corporation, Branchburg, NJ) son dos productos de matriz de tejido dérmico acelular que se venden como láminas. Además, CYMETRA® (también de LIFECCELL®) es una matriz dérmica acelular particulada seca, que se produce por criofractura de la dermis acelular. Cada uno de estos materiales se puede usar para tratar diversas localizaciones anatómicas. STRATTICE™ y ALLODERM® se pueden usar para el aumento de tejidos blandos, por ejemplo, para tratar defectos de la pared abdominal; y CYMETRA® se puede inyectar para el aumento de tejidos blandos.

Aunque algunas matrices de tejido actualmente disponibles son adecuadas para el tratamiento de determinadas localizaciones anatómicas, dichos materiales pueden no ser adecuados para algunas aplicaciones. Por ejemplo, cuando se tratan defectos tisulares de tamaño y geometría variables, por ejemplo, después de la extirpación quirúrgica de un tejido enfermo, las láminas pueden no ser adecuadas para permitir el relleno completo de un sitio de tejido. Además, los materiales particulados se pueden empaquetar o colocar en un sitio de tejido (por ejemplo, en forma de una pasta o masilla), pero es posible que dichos materiales no fluyan adecuadamente para rellenar pequeños defectos, y que no mantengan la porosidad o el espacio suficientes para una rápida infiltración celular y formación de estructuras vasculares. En consecuencia, la presente divulgación proporciona productos de tejido que se pueden usar para rellenar defectos de tejido que tienen geometrías variables y/o irregulares. Además, los productos de tejido de la presente divulgación pueden proporcionar configuraciones adecuadas para permitir el crecimiento celular infiltrante y la formación vascular.

En ciertos modos de realización, se proporciona un producto de tejido. El producto de tejido puede incluir una pluralidad de partículas de matriz de tejido secas. Las partículas se pueden formar a partir de fragmentos de tejido que se unen entre sí para producir el tamaño y conformación de partícula deseados. En diversos modos de realización, las partículas son sustancialmente esféricas y tienen un diámetro entre 1 mm y 5 mm y los fragmentos de matriz de tejido que forman las partículas comprenden una longitud de entre aproximadamente 5 µm y 300 µm.

En el presente documento se describe, pero no se reivindica, se proporciona un procedimiento para producir una composición para el tratamiento de tejidos. El procedimiento puede incluir seleccionar una matriz de tejido y tratar la matriz de tejido para producir fragmentos que tengan una longitud de entre aproximadamente 5 µm y 300 µm. El procedimiento puede comprender además formar los fragmentos en una pluralidad de partículas que tengan una dimensión más larga de entre aproximadamente 1 mm y aproximadamente 5 mm.

En diversos modos de realización se proporciona un producto de tejido. El producto de tejido puede comprender una pluralidad de partículas de matriz de tejido secas que forman una masa fluidizable que se puede verter en un sitio de tejido y fluir para rellenar y ajustarse al sitio de tejido. Las partículas son sustancialmente esféricas y tienen un diámetro entre aproximadamente 1 mm y 5 mm. Las partículas de matriz de tejido comprenden cada una una pluralidad de fragmentos de matriz de tejido que tienen una longitud de entre aproximadamente 5 µm y 300 µm, en la que los fragmentos de matriz de tejido tienen extremos deshilachados que se entrelazan entre sí para unir los fragmentos entre sí para formar las partículas de matriz de tejido.

En determinados modos de realización, los productos de tejido producidos como se describe en el presente documento proporcionan propiedades mejoradas cuando se implantan o durante el almacenamiento. Por ejemplo, los productos descritos en el presente documento pueden ser menos susceptibles al daño causado durante la congelación que otras matrices de tejido acelular. Además, las matrices pueden tener una capacidad mejorada para permitir el crecimiento celular infiltrante y la vascularización.

La fig. 1 ilustra un procedimiento para producir un producto de tejido de acuerdo con diversos modos de realización. Como se muestra en la etapa 101, el procedimiento comienza con la selección de una matriz de tejido 100. Las matrices de tejido adecuadas se analizan más adelante, pero las matrices de tejido pueden incluir cualquier matriz de tejido sustancialmente acelular producida a partir de tejido humano o animal, que conserva la capacidad de sustentar el crecimiento celular infiltrante y la regeneración tisular sin una inflamación excesiva. Determinadas matrices de tejido ejemplares que se pueden usar incluyen STRATTICE™ y ALLODERM® (LIFECCELL® Corporation, Branchburg, NJ), que son matrices dérmicas acelulares porcinas y humanas, respectivamente. Sin embargo, se pueden usar otras matrices de tejido adecuadas, incluyendo, por ejemplo, submucosa del intestino delgado. Además, las matrices de tejido pueden incluir tejidos intactos (no descelularizados) y/o tejidos que se han descelularizado parcialmente y/o poblado con células exógenas.

A continuación, como se muestra en la etapa 111, la matriz 100 se procesa para producir fragmentos 110. Los fragmentos de tejido 110 se pueden formar usando un intervalo de tamaños y diferentes morfologías. Por ejemplo, en algunos modos de realización, los fragmentos de tejido 110 están en forma de pequeñas hebras o hilos de matriz de tejido que se han tratado para producir la distribución de tamaño y/o la conformación deseadas. En diversos modos de realización, las hebras o hilos tienen una longitud de entre aproximadamente 5 µm y 300 µm, de entre aproximadamente 50 µm y 200 µm, de entre aproximadamente 50 µm y 300 µm, o cualquier valor intermedio. En determinados modos de realización, las hebras son de aproximadamente 40 micrones × 140 micrones a 100 micrones por 350 micrones.

Los fragmentos de tejido 110 se pueden producir usando una variedad de procedimientos. Por ejemplo, se puede usar cualquier procedimiento adecuado de corte, triturado, molienda, combinado, cizallado u otro procedimiento mecánico, que produzca el tamaño y la conformación deseados y no cause daños o cambios inadecuados en la matriz de tejido. En determinados modos de realización, los fragmentos de tejido 110 se procesan usando un molino tal como un molino de alimentos SYMPAK® o un molino de atrición QUADRO (Quadro, Canadá). En algunos modos de realización, la matriz de tejido 100 se corta en trozos pequeños (por ejemplo, 4 cm × 4 cm) y a continuación se muele. Además, la matriz se puede combinar brevemente en una solución (por ejemplo, PBS) antes de la molienda.

En algunos casos, las matrices de tejido 100 se pueden procesar para producir los fragmentos 110 cuando están húmedas o sumergidas en un líquido. Por ejemplo, las matrices de tejido 100 se pueden moler o procesar de otro modo cuando se sumergen en un tampón tal como PBS o cualquier otro tampón adecuado. Además, después del procesamiento, el tampón se puede eliminar al menos parcialmente por centrifugación o filtrado para eliminar parte o la totalidad del componente líquido. Por ejemplo, un protocolo de centrifugación adecuado puede incluir centrifugar a 4500 rpm durante aproximadamente 60 min.

Después del procesamiento para producir fragmentos de tejido 110, se forman grupos de los fragmentos 120 para producir partículas 120 que tengan una conformación deseada, como se muestra en la etapa 121. Las conformaciones y tamaños específicos de las partículas 120 pueden variar en base al sitio de implantación previsto, para controlar el espacio entre partículas para proporcionar canales para el crecimiento celular y vascular infiltrante, o para controlar la capacidad de las partículas para fluir hacia un sitio de tratamiento deseado. Las partículas de tejido 120 se pueden conformar usando una variedad de procedimientos de moldeo o conformación. Por ejemplo, los fragmentos 110 se pueden colocar en un molde y/o comprimir, enrollar en una conformación deseada, o manipular manualmente de otro modo para producir la conformación deseada.

En algunos modos de realización, las partículas se pueden formar por inmersión en un líquido frío. Por ejemplo, los fragmentos que contienen un tampón tal como PBS se pueden extruir desde una jeringa y dejar caer lentamente en nitrógeno líquido. El material, cuando se deposita en nitrógeno líquido, formará pequeñas partículas, y las dimensiones relativas de las partículas se pueden controlar controlando la velocidad de extrusión y el contenido de agua de los materiales.

En algunos casos, después de la extrusión, los materiales se pueden procesar aún más para producir una conformación y/o estructura deseadas. Por ejemplo, en algunos casos, los materiales congelados se colocan en un dispositivo de mezcla, tal como una batea. Una batea es un accesorio de cocina para un mezclador, que actúa como un tambor o una hormigonera; gira a una velocidad dada y voltea cualquier objeto que se encuentre en su interior para lograr un recubrimiento de cualquier polvo o líquido que se añada. Sin embargo, se pueden usar otros dispositivos de mezcla similares. Después de la colocación en el dispositivo de mezcla, las hebras secas adicionales producidas como se analiza anteriormente se pueden añadir al dispositivo de mezcla (por ejemplo, en una proporción de partículas y hebras secas de aproximadamente 1:1). Los materiales, con o sin las hebras secas adicionales, se pueden procesar en la batea o dispositivo de mezcla similar para producir una conformación más esférica, y/o cambiar el tamaño de las partículas]. Opcionalmente, las partículas se pueden secar, al menos parcialmente, mientras se encuentran en la batea. Por ejemplo, las partículas congeladas en el dispositivo de mezcla se pueden exponer a niveles bajos de aire caliente (por ejemplo, aproximadamente 48 °C como una velocidad que no expulsa las partículas del dispositivo de procesamiento). A medida que las partículas en el dispositivo de mezcla se calientan y se secan lentamente, se pueden añadir fragmentos de tejido adicionales en forma de polvo seco para mantener las partículas recubiertas. Añadir el polvo seco, de esta manera, puede ayudar a eliminar la humedad

residual de la superficie de las partículas para secar el interior. Opcionalmente, las partículas se pueden secar además dentro del dispositivo de mezcla para eliminar la mayor parte de la humedad.

5 Se puede usar una variedad de conformaciones para las partículas de tejido 120. Por ejemplo, las partículas de tejido 120 se pueden formar en conformaciones sustancialmente esféricas, conformaciones oblongas (por ejemplo, ovoides), cubos, rectángulos, fideos, pirámides o cualquier otra conformación deseada. En algunos modos de realización, la conformación se selecciona para controlar la fluidez cuando se implanta. Por ejemplo, se pueden seleccionar conformaciones esféricas para permitir un alto grado de fluidez. De forma alternativa, se pueden seleccionar conformaciones más oblongas para permitir el relleno de un espacio al tiempo que se evita la migración de una localización deseada. Además, la conformación específica se puede seleccionar para controlar el espacio entre las partículas. Por ejemplo, se puede seleccionar una conformación y un tamaño esféricos para producir determinada cantidad de porosidad para permitir el crecimiento celular infiltrante y/o la formación de estructuras vasculares o extracelulares.

15 Además, el tamaño de las partículas se puede variar en base a la aplicación deseada. Por ejemplo, las partículas pueden tener un diámetro entre aproximadamente 1 mm y aproximadamente 5 mm.

20 En diversos modos de realización, las partículas se procesan de modo que los fragmentos que componen las partículas se unan entre sí para formar estructuras estables, como se muestra en la etapa 131. En determinados modos de realización, los fragmentos se unen sin el uso de cantidades sustanciales de aglutinante o adhesivos. Además, en algunos modos de realización, los fragmentos se secan usando un procedimiento que se cree que une los fragmentos sin una reticulación significativa. Los fragmentos tienen extremos deshilachados que se entrelazan entre sí. Además, en algunos modos de realización, los fragmentos se pueden unir entre sí mediante una unión no covalente. Como se analiza en otra parte, las partículas se pueden secar usando un procedimiento tal como el secado por convección, y dichos procedimientos pueden producir partículas que tienen fragmentos que se unen entre sí.

30 En algunos modos de realización, los fragmentos se unen entre sí mediante reticulación. La reticulación se puede lograr usando varios procedimientos, tales como la reticulación deshidrotérmica, la exposición a luz UV y/o la reticulación química. En algunos modos de realización, se usa un procedimiento de reticulación deshidrotérmica para permitir la reticulación mientras se secan simultáneamente las partículas. Además, utilizando cualquiera de los procedimientos de reticulación, las partículas se pueden secar más (por ejemplo, mediante liofilización o secado al aire) para eliminar la humedad adicional.

35 En diversos modos de realización, los productos de tejido se pueden seleccionar para tener determinadas propiedades que facilitan la implantación y el relleno y/o regeneración de tejido. Por ejemplo, en ciertos modos de realización, las partículas de tejido están secas antes de la implantación. Las partículas secas pueden formar una masa fluidizable que rellenará un vacío o una bolsa en un sitio de tejido. Las partículas de tejido se pueden secar mediante liofilización y/o de forma simultánea con un procedimiento de reticulación deshidrotérmica. Además, en las partículas se pueden seleccionar de modo que se hinchen cuando se pongan en contacto con un entorno acuoso, como puede estar presente en un sitio de tejido. Como tal, las partículas se pueden expandir cuando se implantan para rellenar un sitio de tejido seleccionado.

45 En algunos modos de realización, las partículas se secan mediante calentamiento por convección. Por ejemplo, las partículas congeladas se pueden colocar en un secador por convección (por ejemplo, el secador por convección HARVEST Brand Kitchen). El secado se puede realizar a aproximadamente 45 °C. Sin embargo, se pueden usar temperaturas más bajas o más altas, siempre que no se usen temperaturas que causen una desnaturalización inaceptable u otro daño tisular. Además, se debe tener en cuenta que, incluso cuando se secan parcialmente o en su mayoría, como se describe anteriormente usando una batea, las partículas se pueden secar más para eliminar el exceso de humedad.

50 Después del secado, las partículas se envasan y se esterilizan para formar un producto final 140, como se muestra en la etapa 141. El producto se puede envasar en una variedad de recipientes médicos conocidos y se pueden esterilizar usando procedimientos convencionales siempre que los procedimientos no dañen el producto (por ejemplo, por reticulación excesiva) de una manera inaceptable. En algunos modos de realización, el producto se puede envasar en bolsas de lámina a lámina e irradiar. En algunos modos de realización, el producto se puede irradiado con radiación por haz de electrones. Las dosis adecuadas de haz de electrones pueden incluir 15-22 kGy o intervalos intermedios.

60 Los productos de tejido de la presente divulgación se pueden usar para tratar una variedad de diferentes sitios de tejido blando o tejido duro. Por ejemplo, los productos se pueden usar para reemplazar, reparar, regenerar o aumentar el tejido perdido o destruido debido a una intervención quirúrgica, traumatismo y/o cualquier proceso patológico. En algunos modos de realización, los productos de tejido se pueden implantar en un sitio de tejido blando tal como un sitio de tumorectomía. En otros modos de realización, los productos se pueden usar para tratar o aumentar hueso, músculo, tejido subcutáneo y/o tejido adiposo.

65

En determinados modos de realización, se puede aplicar presión negativa interna dentro del producto de tejido. En determinados modos de realización, la presión negativa puede servir para atraer células del tejido circundante al producto de tejido acelular implantado, incrementando la tasa a la que las células naturales migran hacia el producto de tejido y potenciando la velocidad y/o la eficacia general de la aproximación del tejido.

En determinados modos de realización ejemplares, la presión negativa interna se administra a la matriz de tejido acelular mediante un dispositivo de tratamiento de presión reducida. El dispositivo de tratamiento de presión reducida puede incluir una bomba conectada de manera fluida, por ejemplo, a través de un conducto o tubo de fluido a la matriz de tejido acelular, y que administra presión reducida o negativa a la matriz de tejido acelular. Se puede usar una variedad de dispositivos de tratamiento de presión reducida. Por ejemplo, los dispositivos de tratamiento de presión reducida adecuados incluyen dispositivos de tratamiento V.A.C.® producidos por KCI (San Antonio, Texas).

Matrices de tejido acelular

La expresión "matriz de tejido acelular", como se usa en el presente documento, se refiere, en general, a cualquier matriz de tejido que está sustancialmente libre de células y/o componentes celulares. La piel, partes de la piel (por ejemplo, la dermis) y otros tejidos tales como los vasos sanguíneos, válvulas cardíacas, las fascias, el cartílago, el hueso y el tejido conjuntivo nervioso se pueden usar para crear matrices acelulares dentro del alcance de la presente divulgación. Las matrices de tejido acelular se pueden someter a prueba 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, se pueden usar determinados ensayos 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 tejido. En general, la ausencia de ADN u otros ácidos nucleicos restantes será indicativa de una descelularización completa (es decir, la eliminación de células y/o componentes celulares). Finalmente, se pueden usar otros ensayos que identifican componentes específicos de la célula (por ejemplo, antígenos de superficie) para determinar si las matrices de tejido son acelulares.

En general, las etapas implicadas en la producción de una matriz de tejido acelular incluyen la extracción del tejido de un donante (por ejemplo, un cadáver humano o una fuente animal) y la eliminación de células en condiciones que conserven la función biológica y estructural. En determinados modos de realización, el procedimiento incluye tratamiento químico para estabilizar el tejido y evitar la degradación bioquímica y estructural conjuntamente con o antes de la eliminación de células. En diversos modos de realización, la solución estabilizante detiene y evita la degradación osmótica, hipóxica, autolítica y proteolítica, protege frente a la contaminación microbiana y reduce el daño mecánico que se puede producir con tejidos que contienen, por ejemplo, componentes musculares lisos (por ejemplo, vasos sanguíneos). La solución estabilizante 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 espasmolíticos.

A continuación, el tejido se coloca en una solución de descelularización para eliminar las células viables (por ejemplo, células epiteliales, células endoteliales, células musculares lisas 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, polioxietileno (20) monooleato de sorbitán), uno o más agentes para evitar la reticulación, uno o más inhibidores de la proteasa y/o una o más enzimas. En algunos modos de realización, la solución de descelularización comprende TRITON X-100™ al 1 % en medios RPMI con gentamicina y EDTA (ácido etilendiaminetetraacético) 25 mM. En algunos modos de realización, el tejido se incuba en la solución de descelularización durante la noche a 37 °C con agitación suave a 90 rpm. En determinados modos de realización, se pueden usar detergentes adicionales para eliminar la grasa de la muestra de tejido. Por ejemplo, en algunos modos de realización, se añade desoxicolato de sodio al 2 % a la solución de descelularización.

Después del procedimiento de descelularización, la muestra de tejido se lava bien con solución salina. En algunos modos de realización ejemplares, por ejemplo, cuando se usa material xenogénico, el tejido descelularizado después se trata durante la noche a temperatura ambiente con una solución de desoxirribonucleasa (DNasa). En algunos modos de realización, la muestra de tejido se trata con una solución de DNasa preparada en tampón de DNasa (HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetasulfónico) 20 mM, CaCl₂ 20 mM y MgCl₂ 20 mM). Opcionalmente, se puede añadir una solución de antibiótico (por ejemplo, gentamicina) a la solución de DNasa. Se puede usar cualquier tampón adecuado siempre que el tampón proporcione una actividad DNasa adecuada.

Si bien una matriz de tejido acelular se puede fabricar a partir de uno o más individuos de la misma especie que el receptor del injerto de matriz de tejido acelular, esto no es necesariamente así. Por tanto, por ejemplo, una matriz de tejido acelular se puede fabricar a partir de tejido porcino e implantar en un paciente humano. Las especies que pueden servir como receptores de una matriz de tejido acelular y los 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, cobayas, jerbos, hámsteres, ratas o ratones.

La eliminación de los epítomos α -gal del material que contiene colágeno puede disminuir la respuesta inmunitaria contra el material que contiene colágeno. El epítomo α -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 *et al.*, J. Biol. Chem. 263: 17755 (1988). Sin embargo, este epítomo está ausente en los primates del Viejo Mundo (monos de Asia y África y simios superiores) y en los humanos. Los anticuerpos Id. anti-gal se producen en humanos y primates como resultado de una respuesta inmunitaria a las estructuras de hidratos de carbono del epítomo α -gal en bacterias gastrointestinales. U. Galili *et al.*, Infect. Immun. 56: 1730 (1988); R. M. Hamadeh *et al.*, J. Clin. Invest. 89: 1223 (1992).

Dado que los mamíferos no primates (por ejemplo, cerdos) producen epítomos α -gal, el xenotrasplante de material que contiene colágeno de estos mamíferos a primates a menudo da como resultado un rechazo debido a la unión de anti-Gal de primate 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 *et al.*, Immunology Today 14: 480 (1993); M. Sandrin *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 11391 (1993); H. Good *et al.*, Transplant. Proc. 24: 559 (1992); B. H. Collins *et al.*, J. Immunol. 154: 5500 (1995). Además, el xenotrasplante da como resultado una activación importante del sistema inmunitario para producir mayores cantidades de anticuerpos anti-gal de alta afinidad. En consecuencia, en algunos modos de realización, cuando se usan como fuente de tejido animales que producen epítomos α -gal, la eliminación sustancial de epítomos α -gal de las células y de los componentes extracelulares del material que contiene colágeno, y la obstaculización de la reexpresión de los epítomos α -gal celulares pueden disminuir la respuesta inmunitaria contra el material que contiene colágeno asociado con la unión de anticuerpos anti-gal a los epítomos α -gal.

Para eliminar los epítomos α -gal, después de lavar bien el tejido con solución salina para eliminar la solución de DNasa, la muestra de tejido se puede someter a uno o más tratamientos enzimáticos para eliminar determinados antígenos inmunógenos, si están presentes en la muestra. En algunos modos de realización, la muestra de tejido se puede tratar con una enzima α -galactosidasa para eliminar los epítomos α -gal si están presentes en el tejido. En algunos modos de realización, la muestra de tejido se trata con α -galactosidasa a una concentración de 300 U/l preparada en tampón fosfato 100 mM a pH 6,0. En otros modos de realización, la concentración de α -galactosidasa se incrementa a 400 U/l para la eliminación adecuada de los epítomos α -gal del tejido extraído. Se puede usar cualquier concentración enzimática y tampón adecuados siempre que se logre la eliminación suficiente de antígenos.

De forma alternativa, en lugar de tratar el tejido con enzimas, se pueden seleccionar como fuente de tejido animales que han sido modificados genéticamente para que carezcan de uno o más epítomos antigénicos. Por ejemplo, se pueden seleccionar como fuente de tejido animales (por ejemplo, cerdos) que han sido modificados genéticamente para que carezcan del resto α -galactosa terminal. Para descripciones de animales apropiados, véanse la solicitud de EE.UU. co-pendiente número de serie 10/896,594 y la patente de EE. UU. n.º 6.166.288. Además, determinados procedimientos ejemplares de procesamiento de tejidos para producir matrices acelulares con o sin cantidades reducidas de restos α -1,3-galactosa o que carezcan de los mismos, se describen en Xu, Hui. *et al.*, "A Porcine-Derived Acellular Dermal Scaffold that Supports Soft Tissue Regeneration: Removal of Terminal Galactose- α -(1,3)-Galactose and Retention of Matrix Structure", Tissue Engineering, Vol. 15, 1-13 (2009).

Después de que se forme la matriz de tejido acelular, las células viables, histocompatibles se pueden sembrar opcionalmente en la matriz de tejido acelular para producir un injerto que puede ser remodelado además por el huésped. En algunos modos de realización, se pueden añadir células viables histocompatibles a las matrices mediante técnicas estándar de cocultivo celular *in vitro* antes del trasplante, o mediante repoblación *in vivo* después del trasplante. La repoblación *in vivo* puede ser mediante las propias células del receptor que migran a la matriz de tejido acelular o infundiendo o inyectando células obtenidas del receptor o células histocompatibles de otro donante en la matriz de tejido acelular *in situ*. Se pueden usar diversos tipos de células, incluyendo células madre embrionarias, células madre adultas (por ejemplo, células madre mesenquimales) y/o células neuronales. En diversos modos de realización, las células se pueden aplicar directamente a la parte interna de la matriz de tejido acelular justo antes o después de la implantación. En determinados modos de realización, las células se pueden colocar dentro de la matriz de tejido acelular que se va a implantar, y cultivar antes de la implantación.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un producto de tejido, que comprende:
una pluralidad de partículas secas, sustancialmente esféricas, de matriz de tejido, en el que las partículas tienen un diámetro entre 1 mm y 5 mm, en el que las partículas de matriz de tejido comprenden cada una pluralidad de fragmentos de matriz de tejido que tienen una longitud de entre 5 µm y 300 µm, en el que los fragmentos de matriz de tejido tienen extremos deshilachados que se entrelazan entre sí para unir los fragmentos entre sí, para formar las partículas de la matriz del tejido.
- 10 2. El producto de tejido de la reivindicación 1, en el que las partículas de matriz de tejido incluyen partículas de matriz de tejido dérmico.
- 15 3. El producto de tejido de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que las partículas de la matriz de tejido incluyen partículas de la matriz de tejido porcino.
4. El producto de tejido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que las partículas se hinchan al entrar en contacto con el agua.
- 20 5. El producto de tejido de la reivindicación 1-4, en el que los fragmentos se unen sin utilizar un aglutinante o adhesivo.
6. El producto de tejido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que las partículas son fluidizables cuando están secas.
- 25 7. El producto de tejido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que las partículas forman una estructura porosa con canales abiertos entre cada una de las partículas que puede sustentar el crecimiento celular infiltrante y la vascularización.
- 30 8. El producto de tejido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que los fragmentos de tejido son cadenas alargadas de la matriz de tejido.
9. El producto de tejido de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para su uso en un tratamiento de un defecto tisular.
- 35 10. El producto de tejido de la reivindicación 9, en el que el defecto tisular es un defecto del tejido blando.
11. El producto de tejido de la reivindicación 9, en el que el defecto tisular es un defecto del tejido óseo.
- 40 12. El producto de tejido de la reivindicación 9, en el que el defecto tisular es un defecto en la mama, la piel, el hueso, el cartílago, la vejiga urinaria, el hígado, el riñón, el corazón, la encía o el tejido facial.

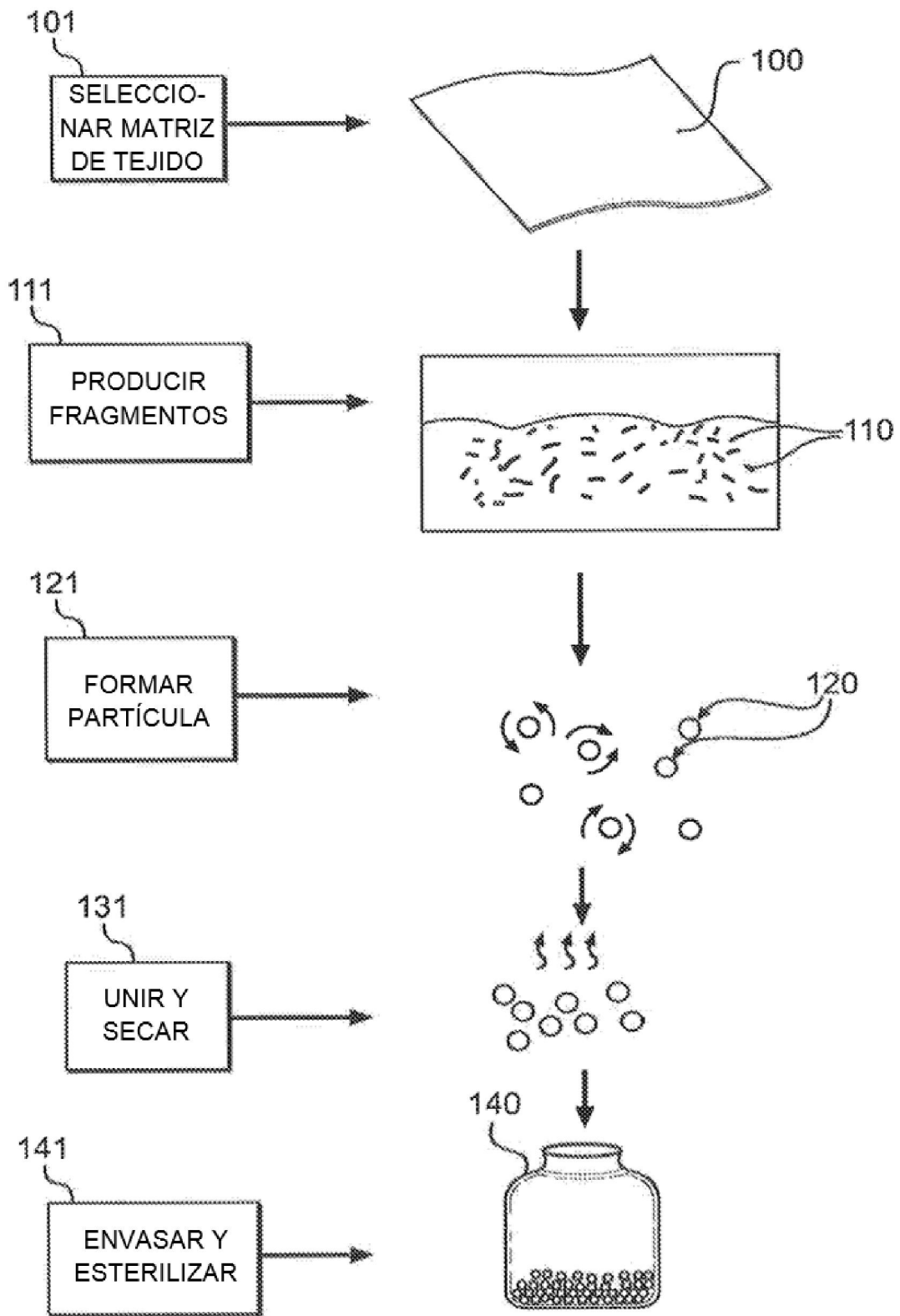


FIG. 1