

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 847 409**

51 Int. Cl.:

A61L 27/24 (2006.01)

A61L 27/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2012 E 18209569 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.10.2020 EP 3473278**

54 Título: **Método para el tratamiento enzimático de productos de tejidos**

30 Prioridad:

28.04.2011 US 201161479937 P

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

03.08.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

CHEN, YI

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 847 409 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

Método para el tratamiento enzimático de productos de tejidos

5 La presente divulgación se refiere a las matrices de tejidos y, de forma particular, a los métodos para controlar la flexibilidad de las matrices de tejidos mediante el tratamiento de las matrices con enzimas proteolíticas.

10 Diversos productos derivados de los tejidos se usan para regenerar, reparar o de cualquier otra manera, tratar los tejidos y órganos enfermos o dañados. Dichos productos pueden incluir injertos de tejido intactos y/o acelulares o tejidos acelulares reconstituidos (por ejemplo, matrices de tejidos acelulares de piel, intestino, u otros tejidos, con o sin siembra celular). Dichos productos generalmente tienen propiedades mecánicas determinadas por la fuente del tejido (es decir, el tipo de tejido y el animal del que se originó) y los parámetros del procesamiento usados para producir los productos de tejido. Dado que los productos de tejidos se usan a menudo para aplicaciones quirúrgicas y/o para el reemplazo o aumento de tejidos, las propiedades mecánicas de los productos de tejidos son importantes.

15 Por ejemplo, los cirujanos generalmente prefieren tejidos que se sientan más naturales y/o que sean fáciles de manipular durante los procedimientos quirúrgicos. Sin embargo, algunos productos de tejidos son indeseablemente rígidos y tienen una sensación no natural. Por consiguiente, se proporcionan los métodos para el tratamiento de los productos de tejidos para producir propiedades mecánicas más deseables. Ionescu y otros, *Annals of University Dunarea de Jos of Galati*, p. 9-16, enero 2008, divulgan un método para ablandar la carne de vacuno. El documento US 2011/021753 divulga un tejido conectivo que se lava con una enzima proteolítica. El documento US 2005/260176 divulga la digestión limitada de un ligamento con una enzima proteolítica.

Resumen

25 La invención se define en las reivindicaciones. De acuerdo con ciertas modalidades, se proporciona un método para el tratamiento de una matriz de tejido. El método puede comprender seleccionar una matriz de tejido dérmico acelular y poner en contacto la matriz de tejido con una enzima proteolítica bajo condiciones suficientes para producir un nivel deseado de flexibilidad en la matriz de tejido.

30 Se describe un método para el tratamiento de una matriz de tejido. El método puede comprender la selección de una matriz de tejido acelular que contiene colágeno y poner en contacto la matriz de tejido con una enzima proteolítica bajo condiciones suficientes para producir un nivel deseado de flexibilidad en la matriz de tejido y aumentar la porosidad de la matriz de tejido.

35 Se describe una matriz de tejido acelular. La matriz puede prepararse mediante un procesamiento que comprende seleccionar una matriz de tejido acelular y poner en contacto la matriz de tejido con una enzima proteolítica bajo condiciones suficientes para producir un nivel deseado de flexibilidad en la matriz de tejido.

Descripción de los dibujos

40 La Figura 1A-Figura 1D muestran las matrices de tejido acelular después del tratamiento con enzimas mediante el uso de los métodos de la presente divulgación, así como los controles no tratados.

45 La Figura 2 es un diagrama de caja de los datos de las pruebas de resistencia a la tracción para las muestras tratadas y de control.

La Figura 3 es un diagrama de caja de los datos de las pruebas de resistencia a la sutura para las muestras tratadas y de control.

50 La Figura 4 es un diagrama de caja de los datos de las pruebas de resistencia al desgarro para las muestras tratadas y de control.

La Figura 5 es un diagrama de caja de los datos de las pruebas de digestión con colagenasa para las muestras tratadas y de control.

55 La Figura 6 es un diagrama de caja de los datos de las pruebas de resistencia a la fluencia para las muestras tratadas y de control.

Descripción de ciertas modalidades ilustrativas

60 A continuación, 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. Siempre que sea posible, se usarán los mismos números de referencia en todos los dibujos para referirse a las mismas partes o a partes similares.

65 En esta solicitud, el uso del singular incluye el plural a menos que se indique específicamente de cualquier otra

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

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

10 Como se usa en la presente descripción "producto de tejido" se referirá a cualquier tejido humano o animal que contenga una matriz extracelular de proteínas. Los "productos de tejidos" pueden incluir 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.

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

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

25
30 reparación del tejido.

Además, los productos de tejidos deben tener una sensación deseable. Por ejemplo, los cirujanos generalmente prefieren materiales que tengan una sensación similar a la de un tejido natural (por ejemplo, que sean suficientemente suaves, flexibles y/o elásticos). Además, después de la implantación, es deseable que los productos de tejidos se sientan más naturales. Por ejemplo, los tejidos usados para el aumento de los senos no deben ser

35 excesivamente rígidos para producir una sensación de los senos más natural.

Sin embargo, algunos productos de tejidos pueden ser excesivamente rígidos. Por ejemplo, algunos cirujanos señalan que los materiales dérmicos de origen porcino tal como STRATTICE™ son menos flexibles que los productos dérmicos humanos tal como ALLODERM®. Sin embargo, los procesos para mejorar la sensación de tales productos no deben afectar negativamente las propiedades biológicas y/o mecánicas de los productos. Específicamente, el procesamiento de los productos para mejorar la sensación de los productos no debe producir una disminución indeseable en otras propiedades mecánicas tal como la resistencia a la tracción, y no debe alterar la matriz de proteínas de tal manera que el material no soporte la regeneración y/o reparación del tejido.

40
45

La presente divulgación proporciona los métodos para el tratamiento de tejidos para mejorar la sensación de los productos de tejidos producidos a partir de los tejidos. La divulgación también proporciona productos de tejidos producidos mediante el uso de los métodos de tratamientos. Además, la presente divulgación proporciona los métodos de tratamiento de los tejidos para controlar la porosidad de los productos de tejidos producidos a partir de los tejidos. En algunos casos, el control de la porosidad puede mejorar la infiltración celular y la regeneración y/o

50 reparación de los tejidos.

En consecuencia, en una modalidad, se proporciona un método para el tratamiento de una matriz de tejido. El método puede comprender la selección de una matriz de tejido que contiene colágeno y poner en contacto la matriz de tejido con una enzima proteolítica bajo condiciones suficientes para producir un nivel deseado de flexibilidad en la matriz de tejido. En otra modalidad, se proporciona un método para el tratamiento de una matriz de tejido. El método puede comprender la selección de una matriz de tejido acelular que contiene colágeno y poner en contacto la matriz de tejido con una enzima proteolítica bajo condiciones suficientes para producir un nivel deseado de flexibilidad en la matriz de tejido y aumentar la porosidad de la matriz de tejido. Las Figura 1A-Figuras 1D muestran matrices de tejido acelular (STRATTICE™) después del tratamiento con enzimas mediante el uso de los métodos de la presente divulgación, así como los controles no tratados. Como se muestra, las muestras tratadas son significativamente más flexibles.

55
60

En varias modalidades, el tratamiento de las matrices de tejidos con enzimas proteolíticas proporciona propiedades mecánicas mejoradas sin causar degradación en una o en las propiedades biológicas. Por ejemplo, el tratamiento de las matrices de tejidos puede producir la rigidez, la sensibilidad, las propiedades táctiles y/o la porosidad deseada

65

sin causar un aumento de la inflamación o la formación de cicatrices y/o sin causar una reducción en la capacidad de las matrices de tejidos para promover el crecimiento y la regeneración celular.

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

En algunos casos, la matriz de tejido puede proporcionarse como una matriz de tejido descelularizado. Las matrices de tejido acelular adecuadas se describen más adelante. En otros casos, el método puede incluir además el procesamiento de tejido intacto para eliminar las células u otros materiales. Los tejidos pueden descelularizarse total o parcialmente para producir matrices de tejido acelular o materiales de tejido extracelular para ser usados por los pacientes. Por ejemplo, varios tejidos, tales como piel, intestino, hueso, cartílago, tejido nervioso (por ejemplo, fibras nerviosas o duramadre), tendones, ligamentos, u otros tejidos pueden descelularizarse total o parcialmente para producir productos de tejidos útiles para los pacientes. En algunos casos, estos productos descelularizados pueden usarse sin la adición de materiales celulares exógenos (por ejemplo, células madre). En ciertos casos, estos productos descelularizados pueden cultivarse con células de fuentes autólogas u otras fuentes para facilitar el tratamiento. Los procesos adecuados para producir las matrices de tejidos acelulares se describen más abajo.

Pueden usarse un número de diferentes enzimas para tratar las matrices de tejidos. Por ejemplo, las enzimas adecuadas pueden incluir sulfidril proteasas tales como la bromelina. Además, pueden incluir bromelina, papaína, ficina, actinidina o sus combinaciones. Las enzimas pueden comprarse comercialmente o extraerse de fuentes frutales. Por ejemplo, una fuente de bromelina es el MCCORMICK MEAT TENDERIZER®, pero las enzimas también pueden extraerse de la piña y/o comprarse en una formulación de grado médico.

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

Como se señaló más arriba, en algunas modalidades, los tejidos se tratan con una enzima para aumentar la porosidad del tejido. En varias modalidades, se realiza el aumento de la porosidad del tejido para aumentar el número y/o el tamaño de los canales, lo que puede mejorar la velocidad de infiltración celular y la regeneración del tejido.

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

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

Matrices de tejido acelular

El término "matriz de tejido acelular", como se usa en la presente descripción, se refiere generalmente a cualquier matriz de tejido que esté sustancialmente libre de células y/o componentes celulares. La piel, las partes de la piel (por ejemplo, la dermis) y otros tejidos tales como vasos sanguíneos, válvulas cardíacas, fascia, cartílago, hueso, y tejido conectivo nervioso pueden usarse para crear matrices acelulares dentro del alcance de la presente descripción. Las matrices de tejido acelular pueden probarse o evaluarse para determinar si están sustancialmente libres de células y/o componentes celulares de varias maneras. Por ejemplo, los tejidos procesados pueden inspeccionarse con microscopía óptica para determinar si quedan células (vivas o muertas) y/o componentes celulares. Además, ciertos ensayos pueden usarse para identificar la presencia de células o componentes celulares. Por ejemplo, pueden usarse ensayos de ADN u otros ácidos nucleicos para cuantificar los materiales nucleares restantes dentro de las matrices de tejidos. En general, la ausencia de ADN restante u otros ácidos nucleicos será indicativo de una descelularización completa (es decir, la eliminación de células y/o componentes celulares). Finalmente, pueden usarse otros ensayos que identifiquen los componentes específicos de la célula (por ejemplo, antígenos de superficie) para determinar si las matrices de tejidos son acelulares. La piel, las partes de la piel (por ejemplo, la dermis) y otros tejidos tales como vasos sanguíneos, válvulas cardíacas, fascia, cartílago, hueso, y tejido conectivo nervioso pueden usarse para crear matrices acelulares dentro del alcance de la presente descripción.

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

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

Después del proceso de descelularización, la muestra de tejido se lava minuciosamente con solución salina. En algunas modalidades ejemplares, por ejemplo, cuando se usa material xenogénico, el tejido descelularizado se trata durante la noche a temperatura ambiente con una solución de desoxirribonucleasa (ADNasa). En algunas modalidades, la muestra de tejido se trata con una solución de ADNasa preparada en tampón de ADNasa (HEPES 20 mM (ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinetanosulfónico), CaCl₂ 20 mM y MgCl₂ 20 mM). Opcionalmente, puede adicionarse una solución antibiótica (por ejemplo, gentamicina) a la solución de ADNasa. Puede usarse cualquier tampón adecuado siempre que el tampón proporcione una actividad ADNasa adecuada.

Si bien una matriz de tejido acelular puede obtenerse a partir de uno o más individuos de la misma especie que el receptor del injerto de la matriz de tejido acelular, este no es necesariamente el caso. Así, por ejemplo, una matriz de tejido acelular puede obtenerse a partir de tejido porcino e implantarse en un paciente humano. Las especies que pueden servir como receptores de la matriz de tejido acelular y donantes de tejidos u órganos para la producción de la matriz de tejido acelular incluyen, sin limitación, mamíferos, tales como seres 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 inmune 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. Gallili y otros, J. Biol. Chem 263: 17755 (1988). Sin embargo, este epítomo está ausente en los primates del Viejo Mundo (monos de Asia y África y simios) y en los seres humanos. Id. Los anticuerpos anti-gal se producen en los seres humanos y los primates como resultado de una respuesta inmune a las estructuras de los carbohidratos del epítomo α -gal en las bacterias gastrointestinales. U. Gallili y otros, Infect. Immun. 56: 1730 (1988); R. M. Hamadeh y otros, J. Clin. Invest. 89: 1223 (1992).

Dado que los mamíferos no primates (por ejemplo, los cerdos) producen epítomos α -gal, el xenotrasplante del material que contiene colágeno de estos mamíferos a los primates a menudo da como resultado un rechazo debido a la unión anti-Gal de los primates a estos epítomos en el material que contiene colágeno. La unión da como

5 resultado la destrucción del material que contiene colágeno por la fijación del complemento y por la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. U. Galili y otros, *Immunology Today* 14: 480 (1993); M. Sandrin y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 11391 (1993); H. Good y otros, *Transplant. Proc.* 24: 559 (1992); B. H. Collins y otros, *J. Immunol.* 154: 5500 (1995). Además, el xenotrasplante da como resultado una importante activación del sistema inmune para producir mayores cantidades de anticuerpos anti-gal de alta afinidad. En consecuencia, en algunas modalidades, cuando los animales que producen epítomos α -gal se usan como fuente de tejido, la eliminación sustancial de los epítomos α -gal de las células y de los componentes extracelulares del material que contiene colágeno, y la prevención de la reexpresión de los epítomos α -gal celulares pueden disminuir la respuesta inmune contra el material que contiene colágeno asociado con la unión del anticuerpo anti-gal a los epítomos α -gal.

10 Para eliminar los epítomos α -gal, después de lavar el tejido minuciosamente con solución salina para eliminar la solución de ADNasa, la muestra de tejido puede someterse a uno o más tratamientos enzimáticos para eliminar ciertos antígenos inmunogénicos, si están presentes en la muestra. En algunas modalidades, la muestra de tejido puede tratarse con una enzima α -galactosidasa para eliminar los epítomos α -gal si están presentes en el tejido. En algunas modalidades, 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 otras modalidades, la concentración de α -galactosidasa se incrementa a 400 U/L para la eliminación adecuada de los epítomos α -gal del tejido cultivado. Puede usarse cualquier concentración de enzima y tampón adecuados siempre que se logre una eliminación suficiente de antígenos.

20 Alternativamente, en lugar de tratar el tejido con enzimas, pueden seleccionarse como fuente de tejido los animales que se han modificado genéticamente para carecer de uno o más epítomos antigénicos. Por ejemplo, los animales (por ejemplo, los cerdos) que se han modificado genéticamente para carecer del residuo α -galactosa terminal pueden seleccionarse como la fuente de tejido. Para las descripciones de los animales apropiados ver la Solicitud de Patente de Estados Unidos núm. de serie 10/896,594 en trámite y la Patente de Estados Unidos núm. 6,166,288. Además, se describen ciertos métodos ilustrativos de procesamiento de tejidos para producir matrices acelulares con o sin cantidades reducidas de o que carecen de residuos alfa-1,3-galactosa en Xu, Hui y otros, "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).

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

Ejemplo

45 El siguiente ejemplo ilustra un proceso para el tratamiento de matrices de tejido acelular dérmico porcino con bromelina para aumentar la flexibilidad del material. Como se analiza más abajo, el tratamiento no provocó un cambio indeseable en varias propiedades mecánicas. Además, el tratamiento aumenta la porosidad del material, lo que puede mejorar la velocidad de infiltración celular y la regeneración del tejido.

50 Para este experimento, se usaron matrices de tejido acelular STRATTICE™, obtenidas de LIFECELL CORPORATION (Branchburg, NJ). STRATTICE™ está disponible en una forma flexible y una versión más firme, en dependencia de la ubicación anatómica de la que se obtuvo el material. Ambos tipos se usaron para este experimento. Las muestras usadas para las pruebas se cortaron en cuartos y se trataron tres cuartos. Las muestras sin tratar (1 cuarto) se usaron como controles; los controles se refrigeraron durante el tratamiento. STRATTICE™ está empaquetada en una solución y, por lo tanto, no requiere rehidratación. Las muestras tratadas se colocaron en 55 0,5 litros de agua fría corriente que contenía 55 g de MCCORMICK MEAT TENDERIZER.

60 La Figura 1A-Figura 1D muestran las matrices de tejido acelular después del tratamiento con enzimas mediante el uso de los métodos de la presente divulgación, así como los controles no tratados. Las Figuras 2-6 son diagramas de caja de las resistencias a la tracción, la resistencia a la sutura, la resistencia al desgarro, la degradación de la elastasa, y la resistencia a la fluencia para cada muestra tratada y de control. Las muestras tratadas tenían una flexibilidad notablemente aumentada en comparación con los controles, pero no tenían una reducción significativa en otras propiedades mecánicas. Además, no se encontró ningún cambio significativo en la temperatura de transición térmica o la susceptibilidad a la colagenasa. La prueba T apareada total no mostró diferencias estadísticas entre los grupos de control y de tratamiento.

REIVINDICACIONES

1. Un método para el tratamiento de una matriz de tejido dérmico acelular, que comprende:
5 seleccionar una matriz de tejido dérmico acelular que contiene colágeno; y
 poner en contacto la matriz de tejido con una enzima proteolítica bajo condiciones suficientes para
 producir un aumento en la flexibilidad de la matriz de tejido.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en donde la enzima se selecciona de bromelina, papaína, ficina, actinidina o
sus combinaciones.
3. El método de la reivindicación 2, en donde la enzima es bromelina.
- 15 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la matriz de tejido se pone en contacto con la
enzima proteolítica bajo condiciones que aumentan la porosidad de la matriz de tejido.
- 20 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la matriz de tejido se pone en contacto con la
enzima proteolítica bajo condiciones que no provocan una reducción estadísticamente significativa en la
resistencia a la tracción, la resistencia al desgarro, la resistencia a la sutura, la resistencia a la fluencia, la
temperatura de transición térmica o sus combinaciones.

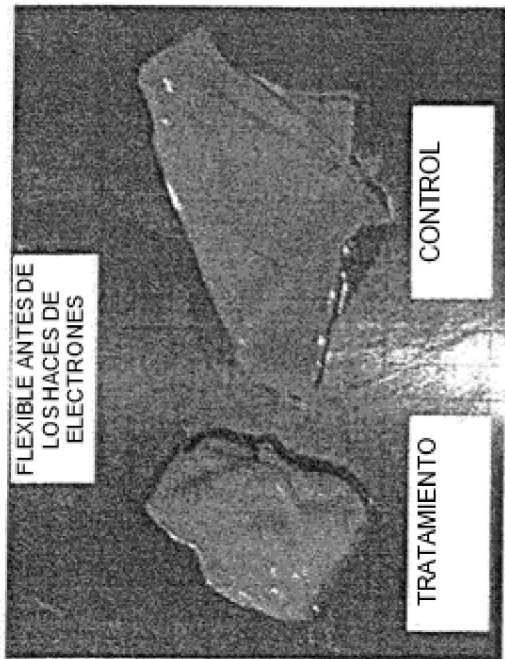


Figura 1A

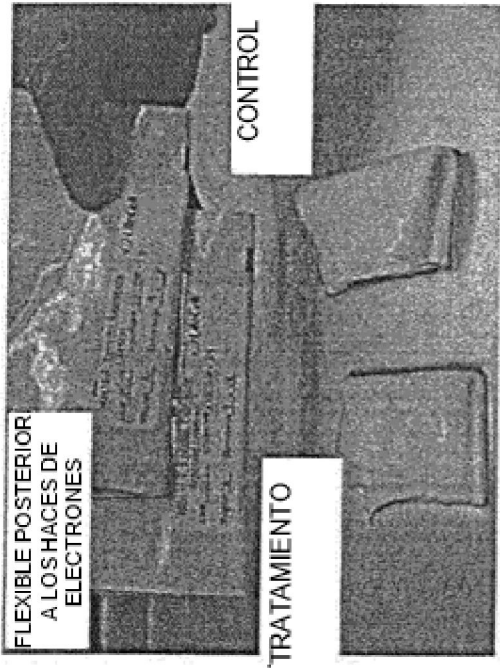


Figura 1C

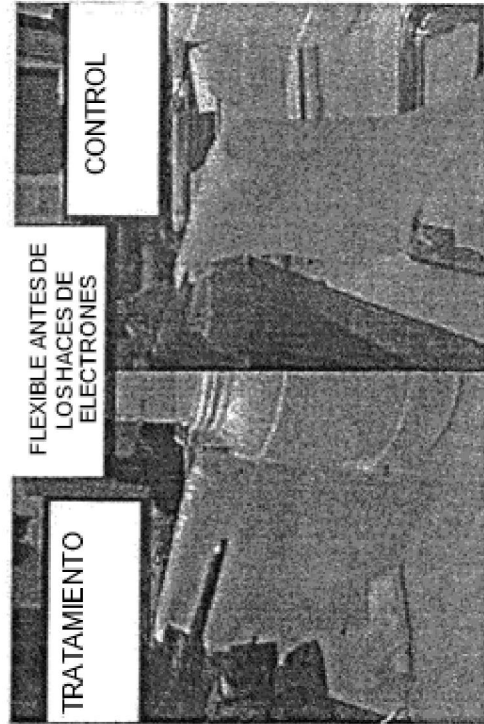


Figura 1B

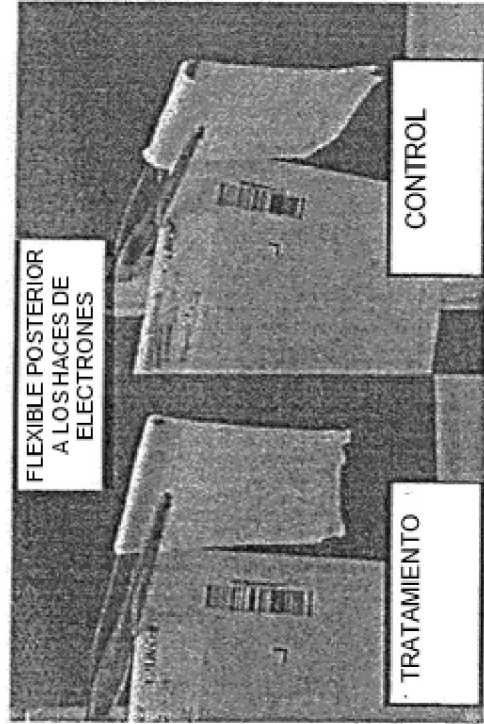


Figura 1D

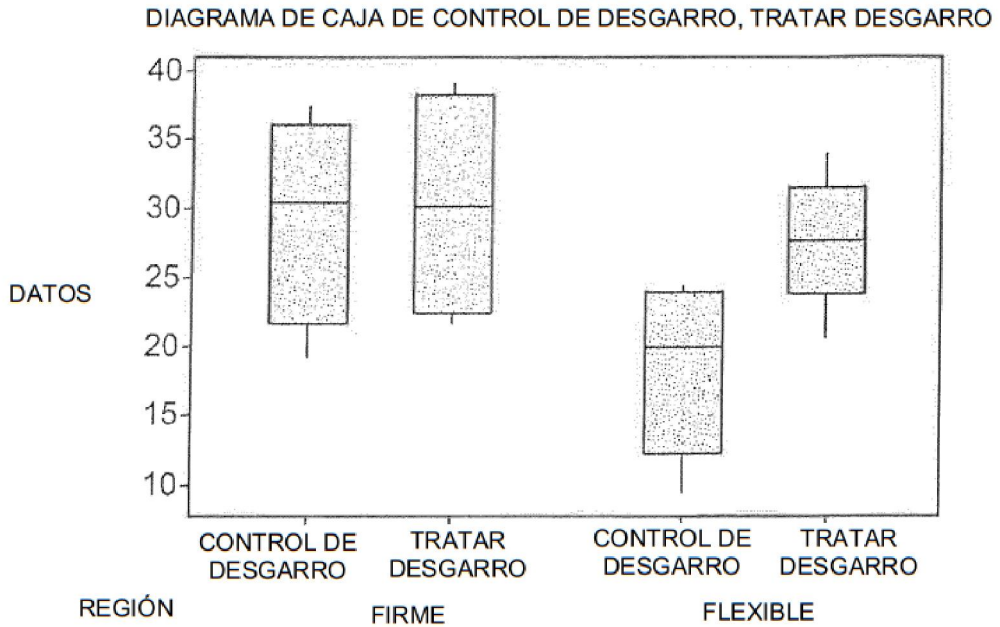


FIGURA 4

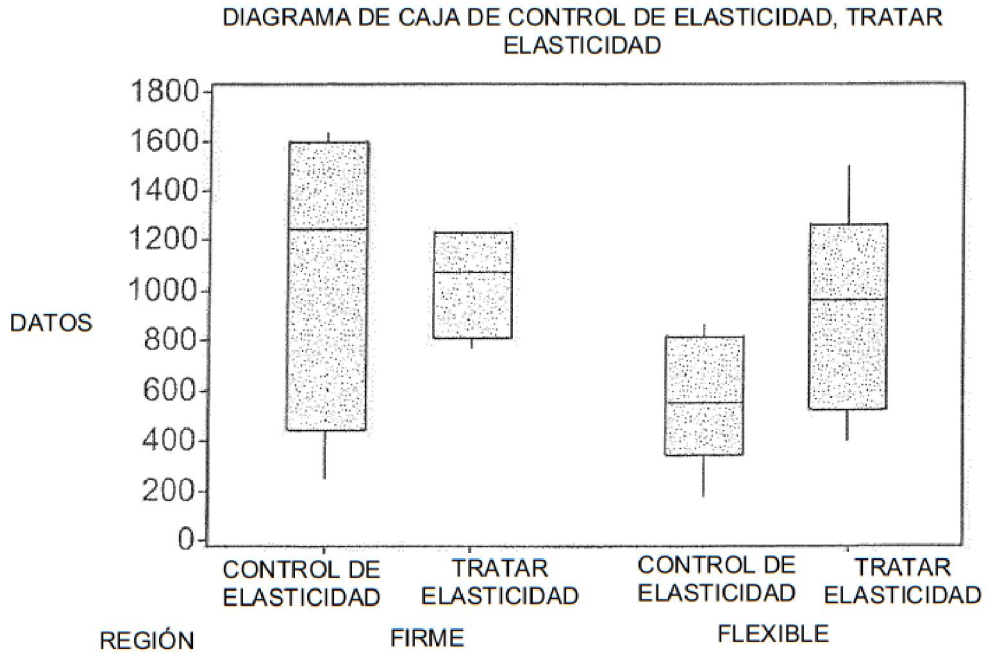


FIGURA 5

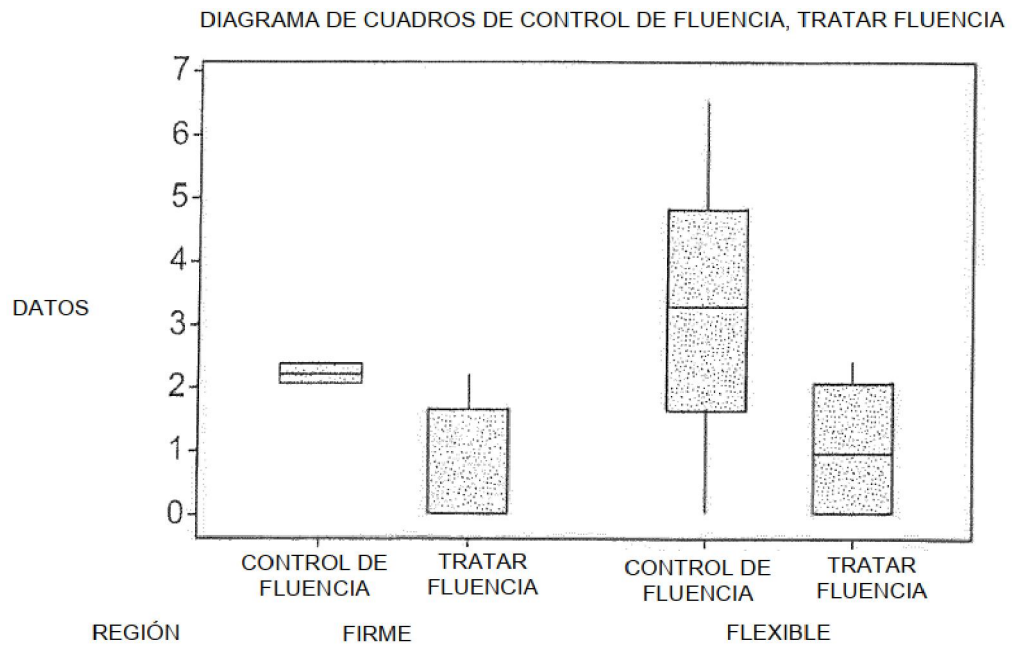


FIGURA 6