

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 014**

51 Int. Cl.:

A61L 27/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.09.2013 PCT/US2013/061563**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.04.2014 WO14052376**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.09.2013 E 13774317 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.01.2018 EP 2900288**

54 Título: **Tejido adiposo procesado**

30 Prioridad:

26.09.2012 US 201261705789 P

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

10.04.2018

73 Titular/es:

**LIFECCELL CORPORATION (100.0%)
One Millennium Way
Branchburg, NJ 08876-3876, US**

72 Inventor/es:

**SUN, WENQUAN y
LIU, XIANGHONG**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 663 014 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

Tejido adiposo procesado

5 La presente divulgación se refiere a productos de tejido, y más particularmente a productos que contienen matrices de tejido extracelular compuestas por tejido adiposo.

Se usan diversos productos derivados de tejido para regenerar, reparar o tratar de otro modo tejidos y órganos enfermos o dañados. Tales productos pueden incluir injertos de tejido y/o tejidos procesados (p.ej., matrices de
10 tejido acelular de piel, intestino u otros tejidos, con o sin siembra celular). Tales productos tienen generalmente propiedades determinadas por la fuente de tejido (es decir, el tipo de tejido y el animal del que se origina) y los parámetros de procesamiento usados para producir los productos de tejido. Puesto que los productos de tejido se usan a menudo para aplicaciones quirúrgicas y/o como reemplazo o aumento de tejido, los productos deberían soportar el crecimiento y regeneración de tejido y evitar una inflamación en exceso, como se desea para el sitio de
15 implantación seleccionado. Los documentos US2012/189555A y US2003/162707 divulgan composiciones de tejido adiposo procesado. La presente divulgación proporciona productos de tejido adiposo que pueden proporcionar un crecimiento, revascularización y regeneración de tejido mejorados en diversas aplicaciones, mientras que se mejora el manejo quirúrgico y se reduce la inflamación. La invención se define mediante las reivindicaciones.

20 De acuerdo con ciertas realizaciones, se proporcionan procedimientos para producir productos de tejido. Los procedimientos incluyen seleccionar un tejido que contiene grasa, tratar el tejido para retirar sustancialmente todo el material celular del tejido y procesar adicionalmente el tejido para reducir el contenido adiposo del tejido. Además, se proporcionan productos de tejido elaborados mediante los procesos divulgados. Los productos pueden comprender una matriz de tejido extracelular adiposo descelularizado y un contenido lipídico reducido. El producto
25 de tejido puede proporcionarse en formato de lámina que es adecuado para uso quirúrgico y/o para manipulación adicional para preparar una conformación de implante deseada, o puede proporcionarse en cualquier otra conformación deseada.

Además, se proporcionan procedimientos de tratamiento. Los procedimientos pueden comprender disponer un
30 producto de tejido adiposo en un sitio quirúrgico para reemplazar, reparar, regenerar, aumentar y/o potenciar un tejido nativo. El producto de tejido puede formarse con una conformación tridimensional predeterminada e implantarse en el tejido hospedador en la localización deseada.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

35 La Fig. 1 es una gráfica que muestra los datos de calorimetría de barrido diferencial que indican el porcentaje de desnaturalización de colágeno en muestras de tejido, preparadas de acuerdo con ciertas realizaciones de la presente divulgación, después de incubación a diferentes temperaturas. Se barrieron las muestras de tejido de 2 °C a 120 °C a 4 °C/min.

40 La Fig. 2 muestra la tinción con hematoxilina y eosina (H&E) de secciones tomadas de productos de tejido adiposo con diferente contenido lipídico (63%, 45% y 72 % de izquierda a derecha) tres meses después de la implantación en monos verdes africanos de acuerdo con ciertas realizaciones de la presente divulgación. Se prepararon las secciones usando tejidos del centro de injertos y las imágenes son a 200X aumentos.

45 La Fig. 3 muestra el título de anticuerpo sistémico (IgG) en suero de mono verde africano con el tiempo después de la implantación de uno de tres productos de tejido adiposo con diferente contenido lipídico (63%, 45% y 72 % basado en la masa seca, respectivamente) de acuerdo con ciertas realizaciones de la presente divulgación.

50 Descripción de ciertas realizaciones ejemplares

Se hará ahora referencia en detalle a ciertas realizaciones ejemplares de acuerdo con la presente divulgación, ciertos ejemplos de las cuales se ilustran en los dibujos adjuntos. Siempre que sea posible, se usarán los mismos números de referencia en todos los dibujos para hacer referencia a las mismas partes o a partes similares.

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

60

Los encabezados de sección usados en la presente memoria sirven meramente para propósitos organizativos y no se deben interpretar como limitantes de la materia en cuestión.

Pueden usarse diversos tejidos humanos y animales para producir productos para tratar pacientes. Por ejemplo, se han producido diversos productos de tejido para regeneración, reparación, reforzamiento y/o tratamiento de tejidos humanos que se han dañado o perdido debido a diversas enfermedades y/o daño estructural (p.ej., por traumatismo, cirugía, atrofia y/o desgaste y degeneración a largo plazo). Igualmente, tales productos se han usado para aumentar o potenciar diversos tejidos. 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 sembrado con células para producir materiales viables). Por ejemplo, ALLODERM® y STRATTICE™ (LifeCell Corp., Branchburg, N.J.) son dos matrices de tejido acelular dérmico compuestas por dermis humana y porcina, respectivamente.

Aunque tales materiales son muy útiles para tratar ciertos tipos de afecciones, pueden ser deseables materiales que tengan diferentes propiedades biológicas y mecánicas para ciertas aplicaciones. Por ejemplo, ALLODERM® y STRATTICE™ pueden no ser ideales para la regeneración, reparación, reemplazo y/o aumento de ciertos tejidos blandos o tejidos que contienen grasa después de la retirada de un volumen de tejido masivo (p.ej., un volumen de al menos aproximadamente 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 1.000 ml o más de tejido). Por consiguiente, la presente divulgación proporciona productos de tejido que pueden disponerse en un sitio quirúrgico para reemplazar, reparar, regenerar, aumentar y/o potenciar un tejido que contiene grasa nativo u otro tejido blando. La presente divulgación proporciona también procedimientos para producir tales productos de tejido.

Los productos de tejido de la presente divulgación pueden incluir tejidos que contienen grasa que se han procesado para la retirada de al menos algunos de los componentes celulares. En algunos casos, se retira todo (o sustancialmente todo) el material celular, mientras que se retienen algunos o sustancialmente todos los componentes de matriz extracelular (p.ej., colágeno, elastina u otras fibras, así como proteoglicanos, polisacáridos y factores de crecimiento). Además, los productos de tejido pueden procesarse adicionalmente para retirar algunos de los lípidos extracelulares y/o intracelulares. Como se describe con más detalle a continuación, el producto de tejido puede proporcionarse en forma de lámina o cualquier otra conformación tridimensional deseada. Además, para permitir el tratamiento de un sitio de tejido seleccionado, el material puede procesarse adicionalmente (p.ej., por irradiación con rayos de electrones o gamma) para reducir la biocarga en el producto de tejido.

Como se señala, los productos de tejido de la presente divulgación derivan de tejidos que contienen grasa. Los tejidos que contienen grasa pueden ser de fuentes humanas o animales, y de cualquier tejido que contenga grasa (p.ej., un tejido que contenga un número sustancial de adipocitos, tal como un tejido en que el contenido lipídico de cuenta de al menos aproximadamente un 20 % de la masa de tejido global). Por ejemplo, el tejido que contiene grasa humano puede obtenerse de uno o más cadáveres, p.ej. de fuentes dérmicas o subdérmicas. El tejido humano adecuado puede obtenerse también de donantes vivos (p.ej., con un tejido autólogo). Además, aunque el tejido que contiene grasa puede derivar de uno o más animales donantes de la misma especie que el animal receptor pretendido, este no es necesariamente el caso. Por tanto, por ejemplo, el producto de tejido puede prepararse a partir de un tejido animal e implantarse en un paciente humano. Las especies que pueden servir como donantes y/o receptores de tejido acelular incluyen, sin limitación, seres humanos, primates no humanos (p.ej., monos, babuinos o chimpancés), cerdos, vacas, caballos, cabras, ovejas, perros, gatos, conejos, conejillos de Indias, jerbos, hámsteres, ratas o ratones. En algunas realizaciones, puede usarse tejido de más de un animal donante.

Si se usan fuentes animales, los tejidos pueden tratarse adicionalmente (p.ej., usando procesos enzimáticos) para retirar componentes antigénicos tales como restos de 1,3-alfa-galactosa, que están presentes, p.ej., en cerdos pero no en seres humanos o primates, y pueden dar como resultado una respuesta inmunitaria después de la implantación. Además, el tejido que contiene grasa puede obtenerse de animales que se han modificado genéticamente para retirar los restos antigénicos. Véase 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). Para descripciones adicionales de animales apropiados y procedimientos de producción de animales transgénicos para xenotrasplante, véanse la solicitud de patente de EE.UU. de número de serie 10/896.594 y la patente de EE.UU. nº 6.166.288.

En ciertas realizaciones, el tejido que contiene grasa se proporciona a partir de capas de tejido dérmico transicionales entre la dermis y la grasa subcutánea. En algunas realizaciones, el tejido que contiene grasa comprende aproximadamente un 20-90 % de contenido lipídico en masa previamente al procesamiento descrito a continuación. En ciertas realizaciones, el tejido que contiene grasa comprende un 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60,

65, 70, 75, 80, 85 o 90% de contenido lipídico en masa previamente al procesamiento (o cualquier porcentaje intermedio). En ciertas realizaciones, el tejido que contiene grasa comprende también un 1-10 % de componentes de matriz extracelular (MEC) (p.ej., colágeno, elastina u otras fibras, así como proteoglicanos, polisacáridos y factores de crecimiento) en masa previamente al procesamiento. En ciertas realizaciones, el tejido que contiene 5 grasa comprende un 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 % de componentes de MEC en masa previamente al procesamiento (o cualquier porcentaje intermedio). En ciertas realizaciones, el tejido que contiene grasa elegido es un tejido dérmico (p.ej., tejido de capas de tejido transicional entre la dermis y la grasa subcutánea) porque estos tejidos proporcionan un contenido de MEC suficientemente alto así como un alto contenido lipídico adecuado para un procesamiento posterior.

10 Una vez se ha proporcionado el tejido que contiene grasa, el tejido puede procesarse formando un producto de tejido. En diversas realizaciones, el procesamiento incluye la descelularización parcial o completa y la retirada parcial de lípidos (es decir, una reducción parcial del contenido lipídico). En algunas realizaciones, ambos procesos se practican simultáneamente. En otras realizaciones, el tejido que contiene grasa se descelulariza primero y se 15 retiran entonces parcialmente los lípidos, o viceversa.

En diversas realizaciones, el tejido que contiene grasa se lava para retirar cualquier crioprotector residual, glóbulos rojos y/o cualquier otro contaminante.

20 Las soluciones usadas para lavar 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. En algunas realizaciones, se descelulariza entonces el tejido mediante la adición de uno o más detergentes a la solución de lavado para retirar células y material celular. Se divulgan procedimientos ejemplares para descelularizar tejidos en la patente de EE.UU. 6.933.326 y la solicitud de patente de EE.UU. 2010/0272782.

25 En diversas realizaciones, las etapas generales implicadas en la producción de un tejido que contiene grasa acelular o parcialmente descelularizado incluyen proporcionar tejido que contiene grasa de un donante (p.ej., una fuente humana o animal) y retirar el material celular en condiciones que mantengan algunos o todos de los componentes biológicos y/o estructurales de la matriz extracelular.

30 En ciertas realizaciones, el tejido que contiene grasa puede tratarse químicamente para estabilizar el tejido para evitar la degradación bioquímica y/o estructural antes, durante o después de la retirada de células. En diversas realizaciones, la solución estabilizante detiene y evita la degradación osmótica hipóxica, autolítica y/o proteolítica; protege frente a la contaminación microbiana y/o reduce el daño mecánico que puede aparecer durante la 35 descelularización del tejido. La solución estabilizante puede contener un tampón apropiado, uno o más antioxidantes, uno o más antibióticos, uno o más inhibidores de proteasas y/o uno o más relajantes de músculo liso.

En diversas realizaciones, el tejido que contiene grasa se dispone en una solución de descelularización para retirar 40 células viables y no viables (p.ej., células epiteliales, células endoteliales, células de músculo liso, fibroblastos, etc.) y componentes celulares sin dañar la integridad biológica y/o estructural de la matriz extracelular. Por ejemplo, pueden usarse enzimas, detergentes y/u otros agentes en una o más etapas para retirar materiales celulares y/u otros materiales antigénicos. La solución de descelularización puede contener un tampón apropiado, sal, un antibiótico, uno o más detergentes (por ejemplo, TRITON X-100™, Tris-[2-dimetilamino]etil]amina, dodecilsulfato de sodio, desoxicolato de sodio, monoleato de polioxietileno(20)sorbitano, etc.), uno o más agentes para impedir la 45 reticulación, uno o más inhibidores de proteasas y/o una o más enzimas. En algunas realizaciones, la solución de descelularización comprende aproximadamente un 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 1,0 %, 1,5 %, 2,0 %, 2,5 %, 3,0 %, 3,5 %, 4,0 %, 4,5 % o 5,0 % (o cualquier porcentaje intermedio) de TRITON X-100™ y, opcionalmente, aproximadamente 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM o 50 mM de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) (o cualquier concentración intermedia). En ciertas realizaciones, la solución de 50 descelularización comprende aproximadamente un 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 1,0 %, 1,5 %, 2,0 %, 2,5 %, 3,0 %, 3,5 %, 4,0 %, 4,5 % o 5,0 % (o cualquier porcentaje intermedio) de desoxicolato de sodio y, opcionalmente, aproximadamente 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, 15 mM o 20 mM de tampón HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico) que contiene aproximadamente 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM o 50 mM de EDTA (o cualquier 55 concentración intermedia). En algunas realizaciones, el tejido se incuba en la solución de descelularización aproximadamente a 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 grados Celsius °C (o cualquier temperatura intermedia) y, opcionalmente, se aplica agitación suave a aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 o 150 rpm (o cualesquiera rpm intermedias). La incubación puede ser durante aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 20, 24, 36, 60 48 o 96 horas (o cualquier tiempo intermedio).

En diversas realizaciones, la longitud del tiempo de exposición a la solución de descelularización y/o la concentración de detergente u otros agentes de descelularización pueden ajustarse para descelularizar parcial o más completamente el tejido. En algunas realizaciones, se retira sustancialmente todo el material celular (p.ej., se retira al menos aproximadamente un 80, 85, 90, 95, 98, 99, 99,5 o 99,9 % del material celular). En ciertas realizaciones, pueden usarse detergentes adicionales y combinaciones de detergentes para retirar células del tejido que contiene grasa. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, se usa una combinación de desoxicolato de sodio y TRITON X-100™. En diversas realizaciones, el proceso de descelularización no altera la estructura y/o función de la matriz extracelular en el tejido que contiene grasa. Por ejemplo, la estructura de la matriz extracelular en el tejido descelularizado puede permanecer sustancialmente inalterada cuando se compara con tejido no descelularizado. En algunas realizaciones, se emplea un procesamiento proteolítico adicional para retirar los componentes de matriz extracelular indeseables. Por ejemplo, puede aplicarse alfa-galactosidasa para retirar los restos de alfa-galactosa.

En algunas realizaciones, p.ej., cuando se usa material xenogénico o alogénico, puede tratarse opcionalmente el tejido descelularizado durante toda la noche a temperatura ambiente con una solución de desoxirribonucleasa (ADNasa). En algunas realizaciones, se trata la muestra de tejido con una solución de ADNasa preparada en tampón de ADNasa (p.ej., HEPES (ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazin-etanosulfónico) aproximadamente 20 mM, CaCl₂ 20 mM y MgCl₂ 20 mM). Opcionalmente, se puede añadir una solución de antibiótico (p.ej., gentamicina) a la solución de ADNasa. Puede usarse cualquier tampón de ADNasa adecuado a condición de que el tampón proporcione una actividad de ADNasa adecuada.

En ciertas realizaciones, después de la descelularización, pueden sembrarse opcionalmente células viables en la matriz extracelular del tejido que contiene grasa parcial o completamente descelularizado. En algunas realizaciones, pueden añadirse células viables mediante técnicas estándares de cocultivo celular in vitro previamente al trasplante, o mediante repoblación in vivo después del trasplante. La repoblación in vivo puede ser mediante la migración de células nativas del tejido circundante a la MEC de un producto de tejido después de la implantación, o mediante infusión o inyección de células viables obtenidas del receptor o de otro donante en el producto de tejido in situ. Pueden usarse diversos tipos celulares, incluyendo células madre tales como células madre embrionarias y/o células madre adultas. Puede usarse también cualquier otra célula viable. En algunas realizaciones, las células son células de mamífero. En ciertas realizaciones, las células son histocompatibles con el sujeto en que se implantan. Tales células pueden promover la migración, proliferación y/o revascularización de células y/o tejidos nativos. En diversas realizaciones, las células pueden aplicarse directamente a la MEC de un producto de tejido justo antes o después de la implantación.

En diversas realizaciones, el tejido que contiene grasa en un producto de tejido puede procesarse para retirar parcialmente los componentes lipídicos. Por ejemplo, el tejido que contiene grasa puede desgrasarse parcialmente exponiendo el tejido a una temperatura elevada, a energía ultrasónica o a una combinación de las dos para fundir o retirar de otro modo un porcentaje deseado de lípidos. Por ejemplo, el tejido puede exponerse a temperaturas de aproximadamente 40-50 °C (p.ej., aproximadamente 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 °C) durante hasta aproximadamente 24 horas (p.ej., aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 o 24 horas, o cualquier periodo de tiempo intermedio) para retirar un porcentaje o tipo deseado de grasa, especialmente especies de grasa insaturada. En algunas realizaciones, la temperatura usada o la longitud de exposición pueden aumentarse para aumentar la cantidad de lípidos retirados, o pueden disminuirse para reducir la cantidad de lípidos retirados. El tejido que contiene grasa puede exponerse también a energía ultrasónica para retirar lípidos. Por ejemplo, el tejido puede exponerse a energía ultrasónica de aproximadamente 20 a 2.000 vatios por metro cuadrado (p.ej., aproximadamente 20, 40, 60, 80, 100, 200, 500, 1.000 o 2.000 vatios por metro cuadrado, o cualquier valor intermedio). La energía ultrasónica puede ser a una frecuencia de aproximadamente 20 a 400 kilohercios (p.ej., aproximadamente 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200, 250, 300, 350 o 400 kHz) y la duración de exposición puede ser de aproximadamente 30 segundos a 8 horas (p.ej., 30 segundos, 45 segundos o 1, 5, 10, 30 o 60 minutos, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 horas o cualquier periodo de tiempo intermedio). El tejido puede exponerse a energía ultrasónica solo o en combinación con altas temperaturas, para retirar un porcentaje deseado de lípidos. En algunas realizaciones, el nivel de energía usado o la longitud de exposición pueden aumentarse para aumentar la cantidad de lípidos retirados, o pueden disminuirse para reducir la cantidad de lípidos retirados. En algunas realizaciones, puede usarse una combinación de alta temperatura y energía ultrasónica. En ciertas realizaciones, pueden usarse uno o más detergentes, tales como dodecilsulfato de sodio o Tris-[2-(dimetilamino)etil]amina en combinación con alta temperatura y/o energía ultrasónica para ayudar a la retirada de lípidos.

En diversas realizaciones, los procesos de descelularización y retirada de lípidos pueden ocurrir simultáneamente. Como alternativa, la descelularización puede llevarse a cabo en primer lugar o la retirada de lípidos puede realizarse en primer lugar.

En algunas realizaciones, después de la descelularización y retirada parcial de lípidos, se lava concienzudamente el tejido que contiene grasa. Puede usarse para lavado 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. En algunas realizaciones, la solución de lavado puede contener un desinfectante. En ciertas realizaciones, el desinfectante es ácido peracético (APA), por ejemplo a una concentración de aproximadamente 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,4 o 0,5 % (o cualquier porcentaje intermedio).

Después de los procesos de descelularización y retirada parcial de lípidos, el producto de tejido contiene aproximadamente un 30-50 % de contenido lipídico (en porcentaje del producto de tejido global en masa). En algunas realizaciones, el producto de tejido contiene aproximadamente un 30, 40 o 50 % de contenido lipídico en masa después del procesamiento (o cualquier porcentaje intermedio).

En diversas realizaciones, se procesa el producto de tejido para retirar suficientes lípidos de tal modo que el producto pueda evitar respuestas inflamatorias y/o inmunológicas significativas después de la implantación (p.ej., por retirada de lípidos de tal modo que el producto de tejido comprenda menos de aproximadamente un 50 % de contenido lipídico). Una inflamación significativa abarca cualquier inflamación que dificultaría la capacidad a largo plazo de que el implante promueva la repoblación de células nativas y la reparación, regeneración, tratamiento o curación de tejido hospedador. La inflamación puede evaluarse, por ejemplo, midiendo el nivel de uno o más marcadores inflamatorios en una muestra tomada de un paciente (p.ej., el nivel de una o más células inflamatorias, citoquinas, inmunoglobulinas u otras moléculas inflamatorias en una muestra de sangre o tejido) y comparando ese nivel con uno o más niveles de referencia.

En ciertas realizaciones, el producto de tejido retiene suficiente contenido lipídico de tal modo que el producto pueda proporcionar un material blando y maleable adecuado para rellenar la conformación potencialmente irregular de un sitio de implante (p.ej., reteniendo al menos aproximadamente un 30 % de contenido lipídico en el producto de tejido).

En algunas realizaciones, después de la descelularización y retirada parcial de lípidos, el producto de tejido contiene una cantidad aumentada de MEC como porcentaje del producto de tejido global en masa. En ciertas realizaciones, el producto de tejido contiene aproximadamente un 3-20 % de MEC en masa. En algunas realizaciones, el producto de tejido contiene aproximadamente un 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 o 20 % de MEC en masa (o cualquier porcentaje intermedio). En ciertas realizaciones, el producto de tejido comprende suficiente MEC después de la descelularización y retirada parcial de lípidos, de tal modo que la MEC pueda proporcionar soporte estructural e integridad para los componentes lipídicos del producto de tejido (p.ej., suficiente soporte estructural de tal modo que el producto de tejido comprenda un material sólido en lugar de una masa amorfa y sebosa de grasa). Por ejemplo, la MEC puede proporcionar un soporte estructural de tal modo que el producto de tejido pueda proporcionarse en láminas, permitiendo así un manejo y manipulación quirúrgicos mejorados antes y/o durante la implantación. En algunas realizaciones, la MEC en un producto de tejido adiposo proporciona también un armazón en que las células nativas y vasos pueden migrar y proliferar desde el tejido circundante de un implante después de implantación quirúrgica en un hospedador.

Después de la descelularización y/o retirada parcial de lípidos, un producto de tejido puede procesarse adicionalmente proporcionando una conformación tridimensional deseada (p.ej., una lámina de producto de tejido). En algunas realizaciones, puede procesarse adicionalmente un producto de tejido para proporcionar una conformación anatómica útil para implantar en un tejido hospedador. Por ejemplo, puede proporcionarse una conformación esférica o cilíndrica, donde el producto de tejido se implantará después de la retirada de un volumen de conformación similar de tejido nativo.

En algunas realizaciones, el producto de tejido adiposo puede tratarse para reducir la biocarga (es decir, para reducir el número de microorganismos que crecen en el tejido). En algunas realizaciones, el producto de tejido tratado carece sustancialmente de biocarga (es decir, el producto de tejido es aséptico o estéril). Los procedimientos de reducción de biocarga adecuados son conocidos por el especialista en la materia, y pueden incluir exponer el producto de tejido a radiación. La irradiación puede reducir o eliminar sustancialmente la biocarga. En algunas realizaciones, se suministra una dosis absorbida de aproximadamente 14-18 kGy de radiación de rayo de electrones o 25-30 kGy de irradiación gamma para reducir o eliminar sustancialmente la biocarga. En diversas realizaciones, se expone un producto de tejido a entre aproximadamente 5 Gy y 50 kGy de radiación (p.ej., aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 kGy o cualquier valor intermedio). Las formas adecuadas de radiación pueden incluir radiación gamma, radiación de rayo de electrones y radiación de rayos X. En algunas realizaciones, se usa irradiación con rayo de electrones. Se describen otros procedimientos de irradiación en la solicitud de EE.UU.

2010/0272782.

En ciertas realizaciones, pueden añadirse uno o más agentes adicionales al producto de tejido adiposo. En algunas realizaciones, el agente adicional puede comprender un agente antiinflamatorio, un analgésico o cualquier otro agente terapéutico deseado. En ciertas realizaciones, el agente adicional puede comprender al menos un factor de crecimiento o señalización añadido (p.ej., un factor de crecimiento celular, un factor angiogénico, un factor de diferenciación, una citoquina, una hormona y/o una quimioquina). En algunas realizaciones, estos agentes adicionales pueden promover la migración, proliferación y/o vascularización de tejido nativo dentro de la MEC de un producto de tejido después de la implantación. En algunas realizaciones, el factor de crecimiento o señalización está codificado por una secuencia de ácido nucleico contenida en un vector de expresión. Preferiblemente, el vector de expresión está en una o más de las células viables que pueden añadirse, opcionalmente, al producto de tejido. Como se usa en la presente memoria, el término "vector de expresión" hace referencia a cualquier constructo de ácido nucleico que pueda captarse por una célula, que contenga una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína deseada y que contenga las demás secuencias de ácido nucleico necesarias (p.ej., promotores, potenciadores, codón de terminación, etc.) para asegurar al menos una expresión mínima de la proteína deseada por la célula.

En diversas realizaciones, los productos de tejidos descritos anteriormente tienen la capacidad de soportar la migración y proliferación de células nativas en la matriz extracelular del producto de tejido después de la implantación, así como la capacidad de promover la regeneración, revascularización, reparación y/o tratamiento de tejido nativo cuando se implante en o sobre un paciente. Además, los productos de tejido tienen la capacidad de actuar como vehículo y soporte del crecimiento de células, incluyendo células madre tales como células madre derivadas de grasa. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, los procesos discutidos anteriormente no deberían alterar las proteínas de matriz extracelular del tejido que contiene grasa (p.ej., dañando las estructuras de proteína y/o retirando glicosaminoglicanos y/o factores de crecimiento importantes). En algunas realizaciones, los productos tendrán bandas de colágeno normales, como se evidencia por microscopía de transmisión de electrones.

En algunas realizaciones, puede almacenarse un producto de tejido adiposo en una solución acuosa adecuada o puede liofilizarse para almacenamiento a largo plazo. El protocolo de liofilización específico puede variar dependiendo del disolvente usado, el tamaño de muestra y/o para optimizar el tiempo de procesamiento. Un proceso de liofilización adecuado puede incluir congelar el producto de tejido a -35 °C durante un período de 45 minutos; mantener las muestras a -35 °C durante 90 minutos para asegurar una congelación completa; aplicar vacío; elevar la temperatura a -10 °C y mantener durante 24 horas; elevar la temperatura a 0 °C y mantener durante 24 horas y elevar la temperatura a 20 °C y mantener durante 12 horas. Las muestras liofilizadas pueden retirarse entonces del liofilizador y envasarse en bolsas de película de aluminio bajo atmósfera de nitrógeno.

Uso de productos de tejido

Los productos de tejido adiposo descritos en la presente memoria pueden usarse para tratar una variedad de diferentes sitios anatómicos. Por ejemplo, los productos de tejido pueden implantarse para rellenar un espacio vacío en un tejido nativo (p.ej., después de lesión o retirada quirúrgica de un volumen masivo de tejido nativo, tal como después de retirada quirúrgica de un tumor). De forma similar, los productos de tejido pueden usarse como implantes o junto con implantes poliméricos para uso en procedimientos cosméticos para aumentar o potenciar un tejido nativo. Por ejemplo, los productos de tejido de la presente divulgación se producen a partir de tejidos que contienen grasa. Por consiguiente, se cree que los productos de tejido adiposo proporcionarán capacidades regenerativas superiores cuando se implanten en ciertos sitios de tejido, en comparación con materiales producidos a partir de otros tipos de tejido. Por ejemplo, los componentes lipídicos retenidos en los productos de tejido parcialmente desgrasados se cree que promueven la deposición y almacenamiento de lípidos dentro y alrededor del producto implantado, mientras que los componentes de MEC del producto implantado proporcionan un almacén para la migración y proliferación de células nativas en el implante, permitiendo así la regeneración de un tejido de apariencia y/o tacto más natural alrededor del sitio de implante. Los productos de tejido implantados pueden promover también la revascularización. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, los productos de tejido divulgados en la presente memoria pueden implantarse en sitios de tejido en un ser humano u otro animal hospedador que comprenden predominante o significativamente tejido adiposo, y los productos implantados pueden promover la reparación, regeneración, tratamiento, aumento y/o potenciación del tejido hospedador.

En algunas realizaciones, los sitios de tejido para implantación de un producto de tejido adiposo pueden incluir mama (p.ej., para aumento, potenciación, reemplazo de tejido extirpado o disposición alrededor de un implante). Además, puede seleccionarse un sitio en cualquier otro tejido adiposo o blando. Por ejemplo, los productos de tejido pueden usarse con fines reconstructivos o cosméticos en cara, cuello, nalgas, abdomen, caderas, muslos y/o

cualquier otro sitio que comprenda tejido adiposo o blando donde se desee reconstrucción o aumento, usando un producto de tejido que tiene una estructura y/o tacto que se aproxima al de la grasa nativa. En cualquiera de esos sitios, puede usarse el tejido para reducir o eliminar arrugas, flacidez o conformaciones indeseadas.

5 Cuando se usa como implantes para reparar, regenerar, tratar, aumentar y/o potenciar tejidos adiposos u otros blandos, los productos de tejido divulgados en la presente memoria pueden proporcionar ventajas frente a otros productos implantados naturales y sintéticos. Por ejemplo, aunque algunos implantes de tejido permiten el crecimiento de células nativas y la formación de tejido (p.ej., implantes de fuentes de tejido no adiposo que comprenden una matriz extracelular), esos implantes pueden inducir la formación de tejido fibrótico que no imita la
 10 textura y/o tacto normal de tejidos adiposos u otros blandos, y pueden aparecer anormales en la imagenología radiológica. Puesto que los productos de tejido de la presente divulgación se forman a partir de tejidos que contienen grasa, pueden evitar o reducir la extensión de la formación de tejido fibrótico. Además, puesto que los productos de tejido retienen algunos componentes lipídicos después de la retirada parcial de lípidos, se cree que los productos implantados promueven la deposición de células adiposas nativas y es menos probable que se endurezcan con el
 15 tiempo, reteniendo así la apariencia y/o tacto del tejido adiposo nativo. En contraposición, los implantes de tejido adiposo que carecen sustancialmente de todos los componentes lipídicos (p.ej., menos de 20 % de la grasa presente previamente al procesamiento) pueden dar como resultado materiales de implante rígidos que carecen de suficiente maleabilidad para usar como rellenos de tejido blando, y que pueden endurecerse también adicionalmente con el tiempo.

20 Además, como se discute anteriormente, los productos de tejido divulgados en la presente memoria pueden proporcionarse en láminas u otras conformaciones tridimensionales adecuadas que retienen la integridad estructural y proporcionan facilidades para la manipulación quirúrgica. Los productos de tejido divulgados en la presente memoria no requieren, en ciertas realizaciones, micronización, homogeneización ni procesamientos adicionales
 25 (p.ej., liofilización y/o reticulación) para proporcionar implantes de tejido maleables aunque estructuralmente estables que no inducen respuestas inmunitarias y/o inflamatorias significativas, en contraposición con ciertos implantes ricos en grasa. Tales implantes ricos en grasa pueden tener una consistencia viscosa y no pueden retener una conformación deseada, y pueden tener también una posibilidad aumentada de inducir una respuesta inmunitaria y/o inflamatoria. En contraposición, los productos de tejido parcialmente desgrasados divulgados en la presente
 30 memoria promueven la deposición de lípidos nativos, evitando las respuestas inflamatorias e inmunológicas que pueden estar asociadas a tejidos adiposos implantados que no se han desgrasado.

Ejemplos

35 Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar, y no limitar en modo alguno, la presente divulgación.

Ejemplo 1: Determinación del contenido lipídico

Para determinar el contenido lipídico, se lavaron muestras de tejido con NaCl al 0,9 % y luego con agua mini-Q. Se
 40 liofilizó el tejido lavado. Se extrajo lípido con cloroformo de las muestras liofilizadas. Se secaron a vacío las muestras de tejido extraídas. Se usó la pérdida de masa de muestra debida a la extracción para determinar el contenido lipídico. Se calculó el contenido lipídico usando la fórmula:

$$\text{Contenido lipídico (\%)} = (\text{Peso seco inicial} - \text{Peso seco extraído}) / (\text{Peso seco inicial}) \times 100$$

45

Ejemplo 2: Descelularización y retirada parcial de lípidos de dermis porcina

Se obtuvieron capas de tejido adiposo porcino a una profundidad de entre 2,75 mm y 4,20 mm para procesamiento. Se determinó que el contenido lipídico de las muestras de tejido adiposo era de $85,9 \pm 6,8$ % (media \pm DE, N= 8)
 50 basado en la masa seca. Se rascó manualmente la grasa suelta sobre la superficie del tejido y se preincubó el tejido durante 22 horas con agitación suave en solución de maltodextrina al 35 % que contenía cefoxitina 0,24 g/l, licomicina 0,12 g/l, vancomicina 0,03 g/l y sulfato de polimixina B 0,1 g/l. El rascado e incubación reducían el contenido lipídico del tejido a $74,8 \pm 12,6$ % (media \pm DE, N= 7) basado en la masa seca. Se almacenó el tejido a -
 80 °C hasta el uso.

55

Para procesamiento adicional, se descongeló el material de tejido congelado a 4 °C durante un periodo de 65 horas. Después de lavar dos veces con tampón HEPES 20 mM (pH 8,0) para retirar la solución de maltodextrina, se
 60 descelularizó el tejido durante ~20 horas en desoxicolato de sodio al 1 % (p/v) disuelto en tampón HEPES 10 mM (pH 8,1) que contenía 0,3 % (p/v) de Triton X100, con agitación. Se aclaró el tejido descelularizado con tampón HEPES 10 mM (pH 7,2) que contenía MgCl₂ 10 mM y CaCl₂ 10 mM. Se añadieron entonces ADNasa y alfa-

galactosidasa a 4 mg/l y 2 mg/l, respectivamente, para tratamiento durante 20 horas. Se lavó la matriz de tejido resultante 3 veces con tampón HEPES (pH 7,2) durante 8 horas para retirar las enzimas residuales. Las etapas de procesamiento daban como resultado una reducción adicional del contenido lipídico. Se almacenó el tejido procesado en tampón citrato-fosfato 4 mM (pH 6,5) que contenía 12 % (p/v) de glicerol, y se esterilizó terminalmente por irradiación gamma de 26 kGy.

El grosor medio de las láminas de matriz de tejido adiposo esterilizado era de $1,0 \pm 0,2$ mm, que es más fino que el material de partida debido a la retirada parcial de lípidos durante el procesamiento. La matriz adiposa blanda tenía una resistencia a la tracción moderada de $2,7 \pm 1,6$ MPa (media \pm DE, N= 48). El contenido de ADN residual era de $0,073 \pm 0,041$ μ g/g (media \pm DE, N= 10) basado en la masa seca, indicando una retirada mayor del 99,5 % del ADN en el tejido. La inmunotinción con lectina era negativa de la presencia de antígeno alfa-gal. Se midieron el contenido lipídico, la densidad de la matriz de tejido no grasa y el contenido de agua de las matrices de tejido adiposo esterilizado, siendo de $37,0 \pm 6,2$ %, $11,8 \pm 2,5$ % y $51,3 \pm 3,8$ % (media \pm DE, n= 5), respectivamente.

15 Ejemplo 3: Descelularización facilitada por ultrasonidos

Se usaron ultrasonidos para ayudar al proceso de descelularización y retirada parcial de lípidos. El primer procedimiento implicaba el tratamiento del tejido antes de la descelularización en solución de desoxicolato de sodio. Se expuso el tejido a alta energía ultrasónica durante 30 segundos (~95 vatios por pulgada cuadrada). Se descelularizó entonces el tejido tratado con ultrasonidos en solución de desoxicolato de sodio al 1 % (p/v).

El segundo procedimiento implicaba la descelularización de material de tejido en un baño de agua ultrasónico de baja energía (Branson ultrasonic cleaner, 44 kilohercios, ~1,0 vatio por pulgada cuadrada) durante hasta 8 horas. Se descelularizó tejido dérmico porcino en dos soluciones diferentes: (a) desoxicolato de sodio al 1 % + Triton X-100 al 0,5 % en tampón HEPES 10 mM (pH 8,0) y (b) dodecilsulfato de sodio al 1 % en tampón HEPES 10 mM (pH 8,0).

Ejemplo 4: Control de temperatura durante la descelularización ultrasónica

El tratamiento ultrasónico genera calor y podría conducir a un aumento de la temperatura de la solución de descelularización. Para evitar la desnaturalización del material de tejido adiposo, se controló la temperatura de solución para mantenerla por debajo de un umbral por encima del cual puede aparecer desnaturalización de colágeno. Para determinar la temperatura apropiada, se incubaron muestras de tejido durante 60 minutos a diferentes temperaturas de entre 44 °C y 60 °C. Después de la incubación, se midió la extensión de la desnaturalización de colágeno con calorímetro de barrido diferencial. Durante la prueba del calorímetro, se barrieron las muestras de tejido de 2 °C a 120 °C a 4 °C/min. Fig. 1 No se observó desnaturalización para tejidos incubados a temperaturas menores de 50 °C. Por tanto, la temperatura de procesamiento de tejido puede elevarse por encima de 40 °C para acelerar el proceso de descelularización.

Ejemplo 5: Rendimiento in vivo

Se evaluó el rendimiento in vivo de injertos de tejido adiposo procesado con alto contenido lipídico de entre aproximadamente 45% y 75 % basado en la masa seca usando un modelo de reparación de pared abdominal funcional de primate (mono verde africano). Se implantaron tres de tales injertos con diferente contenido lipídico (45%, 63% y 72 %) durante 3 meses, y se tomaron muestras de sangre a las 0, 1, 2, 4, 6, 8 y 12 semanas después de la implantación. No hubo herniación en ninguno de los animales, y los tres injertos se integraron bien con los tejidos animales circundantes. El análisis histológico de los materiales extraídos demostró repoblación y revascularización de las células hospedadoras. La Fig. 2 muestra las secciones teñidas con H&E de los tres injertos después de extracción a los 3 meses. No se observó inflamación en el injerto con 45 % de contenido lipídico (basado en el peso seco). Se observó una inflamación significativa solo en el injerto con aproximadamente un 70 % de contenido lipídico (basado en el peso seco). Las pruebas de muestras de sangre tomadas después de la implantación mostraron que la cantidad de anticuerpos de IgG era baja con un aumento transitorio (<128 veces) después de la cirugía, indicando que los injertos inducían reacciones inmunitarias insignificantes (Fig. 3).

La evaluación de primate in vivo demostró que los injertos de tejido con alto contenido lipídico podían integrarse en tejidos hospedadores y soportar la repoblación y revascularización celulares. A medida que aumentaba el contenido lipídico (> aproximadamente 70 %), sin embargo, la inflamación se volvía más grave. Los primates no tenían reacciones de cuerpo extraño significativas ante los injertos.

REIVINDICACIONES

1. Un producto de tejido, que comprende:
 - 5 un tejido que contiene grasa descelularizado,
donde el producto de tejido contiene de 30 a 50 % de lípido en masa.
 2. El producto de tejido de la reivindicación 1, donde el producto de tejido tiene al menos un 3 % de componentes de
10 matriz extracelular como porcentaje del producto de tejido global en masa.
 3. El producto de tejido de la reivindicación 1, donde el producto de tejido está en forma de una lámina.
 4. El producto de tejido de la reivindicación 1, donde el producto de tejido se ha tratado para reducir la biocarga.
15
 5. El producto de tejido de la reivindicación 1, donde el producto de tejido se almacena en solución acuosa o se seca
para almacenamiento.
 6. El producto de tejido de la reivindicación 1, donde el producto de tejido no se microniza ni reticula.
20
 7. Un procedimiento de producción de un producto de tejido de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que
comprende:
proporcionar un tejido que contiene grasa;
25 tratar el tejido para retirar sustancialmente todo el material celular del tejido; y
procesar el tejido para retirar parcialmente los componentes lipídicos para reducir el contenido lipídico al 30 al 50 %
de lípido en masa del producto de tejido.
30
 8. El procedimiento de la reivindicación 7, donde el tejido que contiene grasa es de una o más capas de tejido
transicionales entre la dermis y la grasa subcutánea.
 9. El procedimiento de la reivindicación 7, donde el tejido que contiene grasa comprende un 20-90 % de contenido
35 lipídico como porcentaje del producto de tejido global en masa previamente al procesamiento.
 10. El procedimiento de la reivindicación 7, donde se retira sustancialmente todo el material celular usando uno o
más detergentes, donde el uno o más detergentes comprenden al menos uno de TRITON X-100™, Tris-[2-
(dimetilamino)etil]amina, dodecilsulfato de sodio, desoxicolato de sodio y monooleato de polioxietilen(20)sorbitano.
40
 11. El procedimiento de la reivindicación 7, donde el procesamiento del tejido para retirar parcialmente los
componentes lipídicos comprende exponer el tejido a temperatura elevada, a energía ultrasónica o a una
combinación de los dos,
particularmente donde la temperatura elevada es de al menos 40 °C y/o donde el tejido que contiene grasa se
45 expone a energía ultrasónica de 20 a 2.000 vatios por metro cuadrado a una frecuencia entre 20 y 400 kilohercios.
 12. El procedimiento de la reivindicación 7, que comprende además procesar el tejido que contiene grasa formando
una lámina de producto de tejido.
 - 50 13. El procedimiento de la reivindicación 7, que comprende además tratar el producto de tejido para reducir la
biocarga, particularmente donde tratar para reducir la biocarga comprende exponer el producto de tejido a radiación
por rayo de electrones.
 14. El procedimiento de la reivindicación 7, que comprende además almacenar el producto de tejido en solución
55 acuosa o secar el producto de tejido para almacenamiento, particularmente donde el secado incluye liofilización.
 15. Un producto de tejido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, elaborado mediante un
proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 14.

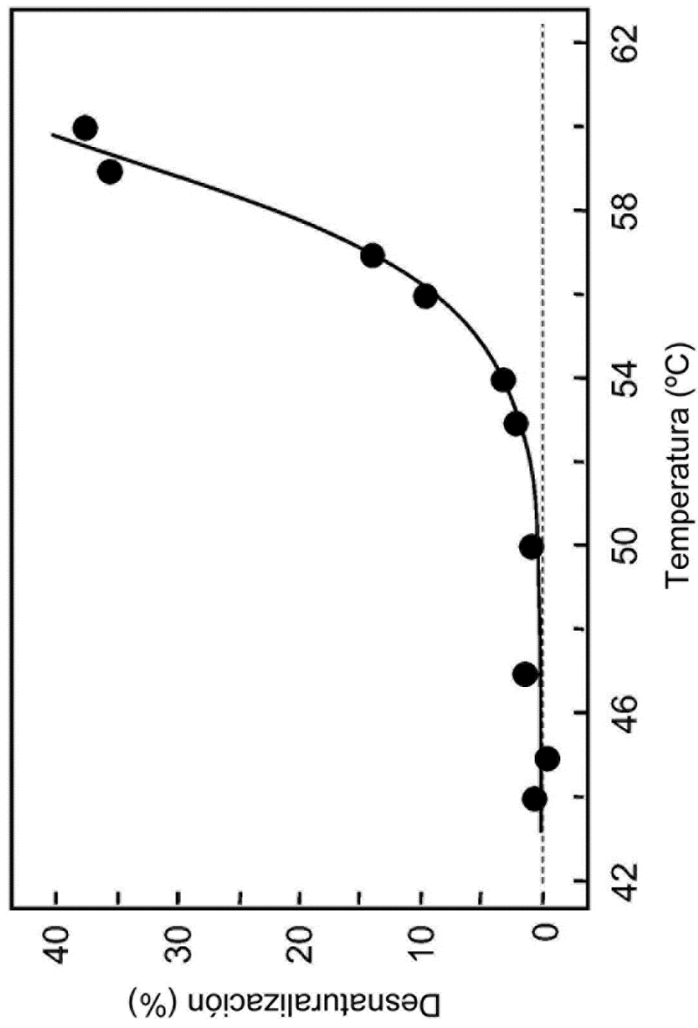


FIG. 1

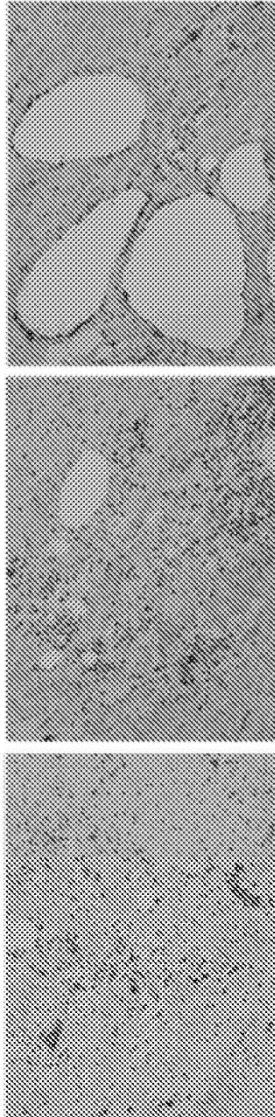


FIG. 2

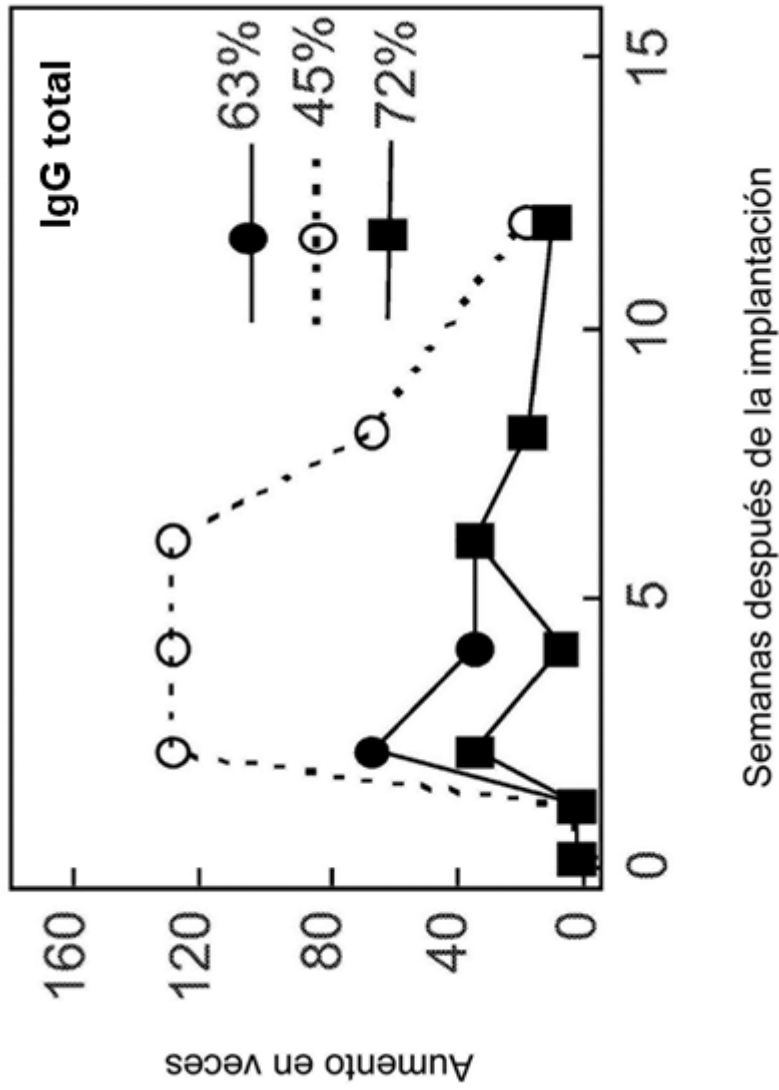


FIG. 3