

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 397 381**

(51) Int. Cl.:

**A61F 2/00** (2006.01)  
**A61L 27/24** (2006.01)  
**A61L 27/56** (2006.01)  
**A61K 35/30** (2006.01)  
**A61L 27/50** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.01.2007 E 07717864 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2012 EP 1981558**

---

(54) Título: **Producto reparador dural y menígeo suturable que comprende matriz de colágeno**

(30) Prioridad:

**12.01.2006 US 758463 P**

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

**06.03.2013**

(73) Titular/es:

**INTEGRA LIFESCIENCES CORPORATION (100.0%)  
311 ENTERPRISE DRIVE  
PLAINSBORO, NJ 08536, US**

(72) Inventor/es:

**ARCHIBALD, SIMON, J.;  
SPILKER, MARK;  
INGRAM, RONALD, T. y  
BRITTAN, JEFFREY, M.**

(74) Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 397 381 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).

## DESCRIPCION

Producto reparador dural y meníngeo suturable que comprende matriz de colágeno.

5 Antecedentes de la invención

1. Campo de la invención

10 Esta invención se refiere a la reparación de tejido dañado, y más específicamente al empleo de colágeno no infeccioso para curar tejido dural dañado.

15 2. Descripción de la técnica relacionada

El cerebro y la médula espinal humanos están revestidos de membranas menígeas cuya integridad es crítica para el funcionamiento del sistema nervioso central. Cuando, de manera intencional o accidental, se pone en peligro la integridad de las membranas menígeas de una persona, pueden derivarse graves consecuencias, a menos que se puedan reparar las membranas.

20 La membrana meníngea comprende tres capas de tejido superpuestas, que son, de fuera a dentro, la duramadre (o "dura"), la aracnoides y la piamadre. La reparación de las membranas menígeas dañadas se ha centrado principalmente en constructos implantables y/o reabsorbibles (conocidos como sustitutos durales), que se injertan sobre la duramadre dañada y están diseñados para reemplazar y/o regenerar el tejido dañado.

25 Integra LifeSciences Corp. comercializa un sustituto dural particularmente eficaz bajo la marca comercial DURAGEN. El producto, que está descrito en la patente de EE.UU. nº 5,997,895, comprende una matriz de colágeno, es totalmente reabsorbido tras el cierre tisular completo del defecto dural y se adapta fácilmente a superficies complejas. La patente de EE.UU. nº 5,997,895 describe que el colágeno que ha sido elaborado utilizando un tratamiento alcalino/salino de acuerdo con la patente de EE.UU. nº 5,019,087 es un producto de sustitución dural sumamente eficaz que ha de llevar a la regeneración de la propia duramadre funcional de un paciente.

30 30 El tratamiento alcalino/salino preferido implica hidróxido de sodio y sulfato de sodio. Los métodos de la patente de EE.UU. nº 5,019,087 proporcionan un tamaño de poro controlado predecible.

A pesar de los muchos beneficios del producto DURAGEN, se desea proporcionar un sustituto dural aún más mejorado. En particular, se desea proporcionar un sustituto dural mejorado con suturabilidad incrementada.

35 35 Se desea además que dicho sustituto dural sea fisiológicamente compatible (es decir, no inflamatorio, no inductor de adherencias, etc.), suficientemente no infeccioso (es decir, descontaminado, etc.) para evitar la transmisión de virus y priones a los receptores del sustituto dural, flexible, esté disponible en diversos tamaños, tenga alta resistencia a la tracción, sea inerte y opcionalmente capaz de formar un cierre estanco al agua.

40 40 El documento EP1561480 (A2) describe un dispositivo de colágeno poroso multicapa para uso como implante para sustituir, reforzar o proporcionar resistencia a tejidos corporales tales como la duramadre. La lámina de colágeno tiene una pluralidad de poros para la fijación de células.

45 Breve compendio de la invención

45 Según la reivindicación 1, un primer aspecto de la invención comprende una matriz para crecimiento tisular, comprendiendo dicha matriz:

una primera capa que comprende un primer conjunto de fibras de colágeno;

50 una pluralidad de proyecciones sobre una superficie superior de la primera capa, en donde las proyecciones tienen un diámetro medio de 0,001-0,5 cm y una altura media de 0,001-0,2 cm, y en donde al menos una parte de la superficie superior de la primera capa tiene al menos una proyección por centímetro cuadrado; y una segunda capa unida a una parte inferior de la primera capa y que comprende un segundo conjunto de fibras de colágeno,

55 en donde la segunda capa tiene una densidad menor que la primera capa, y la matriz comprende poros eficaces para apoyar el crecimiento celular en la matriz.

60 Un segundo aspecto de la invención comprende una matriz para crecimiento tisular, comprendiendo dicha matriz: una primera capa que comprende un primer conjunto de fibras de colágeno, en donde una superficie superior de la primera capa incluye al menos una proyección y poros que tienen tamaños de poro que abarcan de 10 µm a 80 µm, y una parte inferior de la primera capa tiene poros que tienen tamaños de poro que abarcan de 80 µm a 250 µm; y una segunda capa unida a la parte inferior de la primera capa, y que comprende un segundo conjunto de fibras de colágeno y poros que tienen tamaños de poro que abarcan de 10 µm a 500 µm, en donde la segunda capa tiene una densidad menor que la primera capa.

65 65 Un tercer aspecto de la invención comprende una matriz para el crecimiento tisular, comprendiendo dicha matriz:

una primera capa que comprende un primer conjunto de fibras de colágeno, al menos una proyección sobre una superficie superior de la primera capa, y poros de primera capa definidos por paredes de poro de primera capa; y una segunda capa unida a una parte inferior de la primera capa y que comprende un segundo conjunto de fibras de colágeno y poros de segunda capa definidos por paredes de poro de segunda capa;

5 en donde la primera capa tiene una densidad mayor que la segunda capa, sustancialmente todos los poros de la primera capa son más pequeños que sustancialmente todos los poros de la segunda capa, y sustancialmente todas las paredes de poro de la primera capa son más gruesas que sustancialmente todas las paredes de poro de la segunda capa.

10 Un cuarto aspecto de la invención comprende un método para proporcionar la matriz de la invención según la reivindicación 1, en donde el método comprende:

proporcionar una primera mezcla de fibras de colágeno y un primer vehículo líquido;

vaciar la primera mezcla en un primer molde;

15 drenar a través del primer molde una cantidad inicial del primer vehículo líquido para proporcionar una preforma de primera capa;

congelar la preforma de primera capa para proporcionar una preforma de primera capa congelada;

descongelar la preforma de primera capa congelada para proporcionar una preforma de primera capa descongelada;

comprimir la preforma de primera capa descongelada contra el primer molde para drenar a través del primer molde

una cantidad adicional del primer vehículo líquido para proporcionar la primera capa;

20 proporcionar una segunda mezcla de fibras de colágeno y un segundo vehículo líquido;

vaciar la segunda mezcla sobre la primera capa; y

liofilizar la segunda mezcla sobre la primera capa para proporcionar la segunda capa sobre la primera capa y de ese modo proporcionar la matriz.

25 Breve descripción de los dibujos

Se describirá la invención en relación con la Figura 1, que es una micrografía electrónica de barrido con un aumento de 35x de una realización de una matriz de acuerdo con la invención.

30 Descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención

La invención proporciona un medio mejorado para promover el crecimiento tisular. Las realizaciones de la invención incluyen, pero no se limitan a ello, una matriz y un método para promover el crecimiento tisular, en donde el término "matriz", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a un artículo que tiene poros eficaces para apoyar el crecimiento celular en, alrededor de y/o a través del artículo.

35 Aunque la matriz y el método de la invención son particularmente adecuados para reparar tejido meníngeo (es decir, la duramadre, la aracnoides y/o la piámada), también son adecuados para promover el crecimiento tisular y/o la curación de heridas en otras contextos. Por ejemplo, la matriz es adecuada para uso como un apósito

40 bio-reabsorbible para ayudar en la sutura, un dispositivo hemostático suturable, parches para hernia, parches de pericardio, y similares.

45 Haciendo referencia a la Figura 1, la matriz 10 comprende preferiblemente al menos dos capas que comprenden fibras de colágeno: (1) una primera capa 12 con una densidad relativamente alta y poros relativamente pequeños; y (2) una segunda capa 14 con una densidad relativamente baja y poros relativamente grandes. Las paredes de los poros en la primera capa son preferiblemente más gruesas que las paredes de los poros en la segunda capa. Las al menos dos capas están unidas entre sí para formar una matriz integral.

50 La primera capa comprende un conjunto relativamente denso de fibras de colágeno. Se prefiere un conjunto no tejido de fibras, pero dentro del alcance de la invención se encuentran otros conjuntos de fibras, inclusive conjuntos de fibras tejidas. También se puede proporcionar la matriz en forma de una combinación de diferentes conjuntos de fibras. En tal realización, no es necesario que todos los conjuntos de fibras sean suficientemente porosos para promover el crecimiento tisular a través de los mismos, siempre y cuando al menos una forma suficientemente porosa sea accesible al tejido en crecimiento.

55 Preferiblemente, la densidad de la primera capa disminuye siguiendo un gradiente desde su superficie superior hasta su superficie (o parte) inferior. La primera capa tiene una densidad de  $0,005 \text{ mg/mm}^3$  a  $0,4 \text{ mg/mm}^3$ , preferiblemente de  $0,01 \text{ mg/mm}^3$  a  $0,1 \text{ mg/mm}^3$ , más preferiblemente de  $0,025 \text{ mg/mm}^3$  a  $0,075 \text{ mg/mm}^3$ .

60 Preferiblemente, el tamaño de los poros de la primera capa aumenta siguiendo un gradiente desde su superficie superior hasta su parte inferior. Los poros de la superficie superior de la primera capa comprenden tamaños de poro de  $10 \mu\text{m}$  a  $250 \mu\text{m}$ , preferiblemente de  $30 \mu\text{m}$  a  $150 \mu\text{m}$ , más preferiblemente de  $50 \mu\text{m}$  a  $80 \mu\text{m}$ . Los poros de la parte inferior de la primera capa comprenden tamaños de poro de  $10 \mu\text{m}$  a  $500 \mu\text{m}$ , preferiblemente de  $50 \mu\text{m}$  a  $150 \mu\text{m}$ , más preferiblemente de  $80 \mu\text{m}$  a  $120 \mu\text{m}$ .

65 La densidad relativamente alta y porosidad relativamente baja de la primera capa proveen a la matriz de resistencia

mejorada en comparación con determinados productos de la técnica anterior. La resistencia de la primera capa (y/o de toda la matriz) puede ser cuantificada midiendo la resistencia al desgarro mediante cualquier protocolo improvisado o estándar para medir la resistencia al desgarro en materiales no tejidos, tales como las normas ISO 9073-4: 1997, ASTM 5733, ASTM 5734 ó ASTM 5735. En realizaciones preferidas, la resistencia al desgarro en

5 húmedo (es decir, la resistencia al desgarro de una muestra medida no más tarde de 5 minutos después de una inmersión de 5 minutos en una solución salina normal) es de al menos 1,5 N, más preferiblemente al menos 2,5 N, medida mediante una máquina para ensayos de tracción Instron. La resistencia al desgarro incrementada hace que las matrices de la invención sean adecuadas para ser suturadas a tejidos adyacentes, aunque no se requieren suturas para unir la matriz a tales tejidos.

10 La superficie superior de la primera capa incluye preferiblemente al menos una proyección 16, y más preferiblemente incluye una pluralidad de proyecciones. Las proyecciones no están particularmente limitadas en tamaño y forma. En realizaciones preferidas, la cantidad, tamaño, forma y colocación de las proyecciones están dictadas por el paso de compresión de la preforma de primera capa del método de conformación de la matriz, que se

15 describe con mayor detalle más adelante. En el paso de compresión de la primera capa, se drena fluido de la preforma de primera capa por compresión de la misma contra un molde que tiene una o más aberturas de drenaje. Las porciones de la superficie superior de la primera capa que entran en las aberturas son moldeadas por compresión para formar las proyecciones. Así, la cantidad, tamaño, forma y situación de las proyecciones pueden

20 ser ajustados seleccionando un molde que tenga el número deseado de aberturas (es decir, orificios) de drenaje, con las dimensiones deseadas. La Tabla 1 a continuación enumera los intervalos preferidos de cantidades (es decir, densidad) y de tamaño de las proyecciones en matrices de acuerdo con la invención (en la Tabla, las cantidades, diámetros y alturas dentro de una fila determinada son independientes, y no corresponden necesariamente a una realización particular).

25 Tabla 1. Intervalos preferidos de parámetros para proyecciones

	Cantidad (elementos por cm <sup>2</sup> )	Diámetro medio (cm)	Altura media (cm)
Preferido	1-500	0,001-0,5	0,001-0,2
Más preferido	5-100	0,05-0,3	0,02-0,2
Lo más preferido	10-20	0,1-0,15	0,04-0,08

30 Además de estar elevadas sobre la superficie superior de la primera capa, las proyecciones son menos densas y más porosas que las zonas adyacentes. Las aberturas del molde a través de las cuales se permite que se expandan las proyecciones alivian la fuerza de compresión experimentada por las proyecciones, lo que da como resultado proyecciones que son menos densas que zonas adyacentes de la primera capa. Por lo tanto, las proyecciones son más permeables a la infiltración por fluido y tejido que partes adyacentes de la primera capa.

35 Además de aumentar el acceso de fluido y la infiltración por tejidos, las proyecciones ayudan a reducir el movimiento del injerto en la interfaz tisular e incrementan el área de superficie para conseguir una integración tisular incrementada.

40 El molde puede ser diseñado de tal manera que las proyecciones correspondientes en la matriz transmitan colectivamente información, tal como el origen de la matriz, instrucciones para utilizar la matriz (por ejemplo, la palabra "UP" (arriba, en inglés) para indicar al cirujano que mantenga ese lado mirando afuera de la duramadre), etc.

45 La segunda capa está unida a la parte inferior de la primera capa. El término "unido", tal como se emplea en la presente memoria, es sinónimo del término "fijado". Por lo tanto, la naturaleza de la unión no está particularmente limitada. En realizaciones preferidas, las dos capas están unidas entre sí por fibras de colágeno entremezcladas. No se requiere el uso de adhesivos, pero está dentro del alcance de la invención.

50 La segunda capa comprende preferiblemente un segundo conjunto, preferiblemente no tejido, de fibras de colágeno, que tiene una segunda densidad de 0,001 mg/mm<sup>3</sup> a aproximadamente 0,12 mg/mm<sup>3</sup>, preferiblemente de 0,005 mg/mm<sup>3</sup> a 0,1 mg/mm<sup>3</sup>, más preferiblemente de 0,009 mg/mm<sup>3</sup> a 0,05 mg/mm<sup>3</sup>, y un tamaño de poro de aproximadamente 50 µm a aproximadamente 150 µm. El tamaño de poro abarca preferiblemente de aproximadamente 10 µm a aproximadamente 500 µm, más preferiblemente de aproximadamente 50 µm a aproximadamente 150 µm, siendo los poros superficiales más pequeños que los poros de sección transversal (internos). En realizaciones particularmente preferidas, el tamaño de poro de poros superficiales abarca de aproximadamente 30 µm a aproximadamente 150 µm, siendo el más preferido aproximadamente 70 µm, y el tamaño de poro de poros de sección transversal abarca de aproximadamente 50 µm a aproximadamente 300 µm, siendo el más preferido aproximadamente 150 µm.

55 La segunda capa está destinada a ser puesta en contacto con el tejido que debe ser hecho crecer. La densidad relativamente baja y la porosidad relativamente elevada de la segunda capa la hace particularmente favorable a la infiltración por tejido naciente que brote de tejido adyacente. Preferiblemente, la segunda capa también permite la

infiltración por fluidos de la herida y coágulos de fibrina. La formación de coágulos de fibrina dentro de la matriz crea una rápida barrera mecánica contra la pérdida de fluido cerebroespinal (CSF, por sus siglas en inglés).

5 Se puede aplicar la matriz utilizando una técnica de superposición (en inglés "onlay") o una técnica de sutura, dependiendo de la necesidad clínica y la preferencia del cirujano. Si el cirujano decide emplear suturas, las picaduras de sutura deben situarse preferiblemente a 2-3 mm del borde del injerto. Se debe aplicar a la sutura la tensión mínima adecuada cuando se sutura o se hace un nudo. El uso de adhesivos, tales como pegamento de fibrina, para ayudar a unir la matriz a tejidos adyacentes es opcional.

10 Preferiblemente, la matriz es suficientemente flexible cuando está húmeda para ajustarse a una superficie de un tejido subyacente.

15 Aunque una matriz de dos capas es la realización preferida, está también dentro del alcance de la invención el proporcionar una matriz que tenga tres, cuatro, cinco o más capas. Estas capas adicionales comprenden preferiblemente fibras de colágeno ensambladas como un material no tejido, un tejido o una película. La matriz puede ser proporcionada en forma de un material compuesto de dos o más cualesquiera de las formas precedentes.

20 En una realización preferida que tiene más de dos capas, se añade una tercera capa a las primera y segunda capas descritas más arriba, en donde la tercera capa es sustancialmente similar a la primera capa y la segunda capa está emparejada entre las capas primera y tercera. La tercera capa es preferiblemente un conjunto no tejido de fibras de colágeno unidas a la superficie inferior del segundo conjunto.

La matriz es fisiológicamente compatible y está sustancialmente libre de virus y priones.

25 Preferiblemente, la matriz es un objeto plano que tiene poros de un tamaño y en una cantidad suficientes para permitir que tejido meníngeo en crecimiento infiltre dicha matriz. La longitud y la anchura de la matriz están dictadas por su uso previsto. Ciertas realizaciones de la matriz tienen aproximadamente 1-15 cm de longitud y de anchura. El grosor de la matriz está relacionado con el número de capas, la altura de las proyecciones y la densidad de cada capa. Ciertas realizaciones de la matriz tienen aproximadamente 3,0 mm - 4,5 mm de grosor.

30 Opcionalmente, la matriz puede haber sido reticulada por calor o mediante un agente reticulante químico adecuado. Véase, por ejemplo, Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking (compilado por Wong, CRC Press, 1993). Por ejemplo, se puede haber reticulado la matriz por exposición a los vapores de una disolución acuosa de formaldehído (preferiblemente con una concentración de formaldehído de 9,6%) durante unos noventa minutos a aproximadamente 25°C, seguida de ventilación con aire forzado durante aproximadamente una hora.

35 El método para producir la matriz de la presente invención emplea pasos que son reconocidos como eficaces para inactivar la contaminación vírica y por priones. Esto proporciona a la matriz un nivel de seguridad muy alto, al tiempo que elimina la respuesta inflamatoria. Es decir, el método para producir la matriz de la invención proporciona una matriz que está sustancialmente libre de virus y priones, sin ser fisiológicamente incompatible. La frase "sustancialmente libre de virus y priones" significa que la matriz no contiene cantidades de virus y priones eficaces para infección. Más específicamente, la invención comprende preferiblemente el uso de colágeno tratado mediante un procedimiento suficiente para lograr al menos una eliminación de virus de 4 unidades logarítmicas, más preferiblemente al menos una eliminación de virus de 6 unidades logarítmicas, e incluso más preferiblemente al menos una eliminación de virus de 8 unidades logarítmicas, medidas con un nivel de confianza estadístico de al menos 95%. Por ejemplo, si la concentración de virus antes del tratamiento es  $10^7$  y después del tratamiento es  $10^1$ , entonces se ha producido una eliminación de virus de 6 unidades logarítmicas.

40 50 En la preparación de la matriz de la presente invención, se provee una primera mezcla de fibras de colágeno y un primer vehículo líquido. La mezcla es preferiblemente una dispersión de colágeno preparada de una manera bien conocida en la técnica. Una de estas preparaciones se enseña en la patente de EE.UU. nº 3,157,524. Otra preparación conveniente de colágeno se enseña en la patente de EE.UU. nº 3,520,402. En ciertas realizaciones, la dispersión de colágeno se prepara mediante el método siguiente.

45 55 Primeramente se limpia, mecánicamente o mano, de grasa, fascia y otras materias extrañas una fuente nativa de colágeno de tipo I, tal como piel, tendones, ligamentos o huesos, y se lava. El material que contiene colágeno, limpio y lavado, se desmenuza después, generalmente mediante corte o trituración.

60 65 A continuación se somete el material, mientras es agitado de manera intermitente, a un tratamiento enzimático con una enzima proteolítica, tal como ficina, pepsina y similares, con el fin de eliminar impurezas no colágenas que pueden provocar actividad antigénica y para hinchar el colágeno por eliminación de elastina. La cantidad de enzima añadida al material de colágeno y las condiciones en que tiene lugar la digestión enzimática dependen de la enzima particular que se utilice. Generalmente, cuando se utiliza ficina, que es la utilizada más comúnmente, se ajusta el pH a aproximadamente 6,0 hasta 6,3, y se digiere el material de colágeno durante aproximadamente 1 a 2 horas a una temperatura de aproximadamente 36,5°C a 37,5°C con una parte de ficina por cada 150 partes de material de colágeno. Una vez transcurrido el tiempo requerido, se inactiva la enzima por medios adecuados bien conocidos en

la técnica, por ejemplo mediante la adición de una solución de un agente oxidante, tal como clorito de sodio cuando la enzima es ficina.

5 A continuación se lava el material que contiene colágeno, enzimáticamente tratado, para eliminar el exceso de enzima y las impurezas de proteína no colágena. Preferiblemente, el lavado se lleva a cabo con agua ultrafiltrada y desionizada, y opcionalmente se lava adicionalmente con peróxido de hidrógeno acuoso diluido.

10 En una realización preferida de la presente invención, el material que contiene colágeno, digerido enzimáticamente, es sometido además a un tratamiento alcalino a un pH de aproximadamente 13 a 14, a una temperatura de aproximadamente 25°C a 30°C durante un período de aproximadamente 35 a 48 horas, con preferencia aproximadamente 40 horas. Convenientemente, el tratamiento alcalino se lleva a cabo en una disolución acuosa de hidróxido de sodio al 5% y sulfato de sodio al 20%. Este tratamiento alcalino elimina glicoproteínas y lípidos contaminantes. Después se neutraliza la disolución con un ácido adecuado, tal como ácido sulfúrico acuoso, y se lava a fondo.

15 15 A continuación, el material de colágeno es hinchado adicionalmente con una disolución de ácido adecuada cuyo ácido no provoque ninguna reticulación del colágeno. Estos ácidos son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen ácido acético, ácido clorhídrico, ácido láctico, y similares. Independientemente de cuál sea el ácido utilizado, el pH de la dispersión ácida de colágeno se sitúa en el intervalo de aproximadamente 2 a 3.

20 20 La mezcla de colágeno dispersada se homogeneiza a continuación por cualquier medio convencional, por ejemplo con un mezclador u homogeneizador, con el fin de disociar aún más las fibras, y después, para eliminar material no colágeno sin hinchar, se filtra por medios bien conocidos en la técnica tales como hacer pasar la dispersión a través de un tamiz de acero inoxidable de malla 100. La dispersión de colágeno filtrada resultante puede ser utilizada 25 después para preparar la matriz de la presente invención.

30 Como alternativa, se puede obtener colágeno fisiológicamente compatible que esté sustancialmente exento de virus y priones activos, a partir de animales transgénicos criados con el fin de sintetizar colágeno humano de una forma fácilmente cosechable. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5,667,839 de Berg. Dado que los animales transgénicos pueden ser criados y mantenidos en ambientes controlados, que impiden que sean portadores de infecciones que deban ser inactivadas, el colágeno cosechado de los mismos es fisiológicamente compatible y está sustancialmente libre de virus y priones activos sin tratamiento adicional (aunque se pueden efectuar tratamientos adicionales como medida de seguridad añadida).

35 35 El colágeno pueden ser fibras de colágeno obtenidas con ácido láctico. Tales fibras se producen mediante un procedimiento que comprende dispersar una fuente de colágeno libre de virus y de priones (por ejemplo, cortes de tendón de bovino tratados con álcali) en una disolución acuosa de ácido láctico (con preferencia aproximadamente al 85%), homogeneizar la dispersión, filtrar la dispersión homogeneizada en ácido láctico, y precipitar fibras de colágeno de la dispersión de ácido láctico homogeneizada, mediante la adición de hidróxido amónico acuoso (preferiblemente al 0,35%) suficiente para ajustar el pH a aproximadamente 4.6-4.9.

40 45 Las fibras de colágeno obtenidas con ácido láctico y precipitadas con hidróxido amónico son mucho más largas que las fibras producidas por la rotura mecánica/química de material bruto de tendón de bovino. Durante la precipitación con hidróxido amónico, las fibras de colágeno se retraen, y son por lo tanto más largas. Las fibras más largas proporcionan mayor resistencia al producto final. La mayor resistencia de los productos de la invención obtenidos por este método particularmente preferido puede hacer que sean lo suficientemente fuertes para ser estancos al agua y suturables sin necesidad de reticulación, permitiendo así que el grado de reticulación se elija en base a la velocidad de reabsorción deseada.

50 55 50 Se dispersan en agua las fibras de colágeno para proporcionar la primera mezcla. En ciertas realizaciones, la primera mezcla es una dispersión de acuerdo con las enseñanzas de la patente de EE.UU. nº 4,963,146. Se vacía la primera mezcla en un primer molde. El molde es preferiblemente una bandeja perforada hecha de un metal, por ejemplo aluminio. El molde puede comprender un revestimiento antiadherente, si se desea. La cantidad y dimensiones de las perforaciones por todo el molde son seleccionadas para proporcionar a la matriz las características deseadas, y/o para alcanzar una velocidad de drenaje de líquidos desde el molde deseada.

60 65 60 Despues se drena por gravedad una cantidad inicial del vehículo líquido de la primera mezcla que se encuentra en el primer molde, a través de la o las perforaciones, para proporcionar una preforma de primera capa en el molde. Preferiblemente se congela y después se descongela la preforma de primera capa para liberar humedad adicional. A continuación, la preforma descongelada es comprimida contra el primer molde para drenar a través del primer molde una cantidad adicional del primer vehículo líquido, y proporcionar la primera capa.

65 La compresión se lleva a cabo preferiblemente emparedando la preforma descongelada entre dos moldes sustancialmente idénticos. El primer y/o el segundo molde son presionados contra la preforma descongelada en una dirección sustancialmente perpendicular a los planos definidos por las superficies de los moldes que están en

contacto con la preforma. Cuando el segundo molde tiene aberturas de drenaje, el primer vehículo líquido puede drenar a través de ambos moldes, primero y segundo, y la primera capa resultante tiene proyecciones en sus superficies superior e inferior. Las proyecciones inferiores son finalmente cubiertas por la segunda capa que se une a la superficie inferior de la primera capa.

- 5 La cantidad de presión aplicada en la compresión se selecciona de tal manera que la primera capa resultante tenga la densidad y porosidad deseadas. La matriz de colágeno es comprimida desde aproximadamente 10 mm de grosor hasta 1-2 mm y muy preferiblemente 1,5 mm. Preferiblemente, a la primera capa se le dota de los intervalos de tamaño de poro discutidos más arriba.
- 10 En realizaciones preferidas, se vacía una segunda mezcla de fibras de colágeno y un segundo vehículo líquido sobre la primera capa que se encuentra en el primer molde. El contenido de colágeno en la dispersión acuosa está controlado en un valor entre 0,5-1,0% peso/volumen, con un objetivo nominal de 0,75% peso/volumen. La segunda mezcla puede ser igual o distinta de la primera mezcla. En ciertas realizaciones, las primera y segunda mezclas son extraídas de una fuente común (por ejemplo, una suspensión madre). En ciertas realizaciones, la segunda mezcla es una dispersión de acuerdo con la patente de EE.UU. nº 5,997,895.
- 15 A continuación se liofiliza la segunda mezcla con la primera capa, para proporcionar la segunda capa sobre la primera capa y de ese modo proporcionar la matriz.
- 20 En realizaciones alternativas, se puede formar la segunda capa como un componente independiente y después unirla a la primera capa mediante adhesivo u otros medios.
- 25 En ciertas realizaciones también se pueden incorporar a la matriz capas adicionales a las capas primera y segunda. Tales capas adicionales pueden ser formadas sobre la capa subyacente o bien ser formadas de manera independiente respecto a la matriz y unirse a la capa subyacente.
- 30 Por ejemplo, se puede proporcionar una tercera capa sobre la segunda capa de la manera siguiente. En primer lugar, se provee una tercera mezcla de fibras de colágeno y un tercer vehículo líquido. La mezcla es, preferiblemente, una dispersión de fibras de colágeno en agua. La tercera mezcla puede ser idéntica o distinta de las primera y/o segunda mezclas. En ciertas realizaciones, las primera, segunda y/o tercera mezclas son extraídas de una fuente común.
- 35 Se vacía la tercera mezcla en un segundo molde. El segundo molde puede ser idéntico o diferente del primer molde.
- 40 Se permite que una cantidad inicial del tercer vehículo líquido drene por gravedad a través del segundo molde para proporcionar una preforma de tercera capa. Despues se congela y se descongela la preforma de tercera capa para drenar de la misma líquido adicional.
- 45 La preforma de tercera capa descongelada es comprimida a continuación contra el segundo molde para drenar a través del segundo molde una cantidad adicional del tercer vehículo líquido, y proporcionar la tercera capa. Este paso se lleva a cabo preferiblemente de una manera idéntica a la utilizada para formar la primera capa.
- 50 Se comprime la tercera capa de manera que tenga una porosidad de tercera capa objetivo equivalente a una de las otras dos capas, sea de una porosidad mayor o de una porosidad menor. Por ejemplo, para proporcionar un sistema de tres capas en donde las dos capas externas comprendan una matriz de tracción densa, la tercera capa puede contener poros que tengan un tamaño de poro dentro de los intervalos antes discutidos en relación con las capas primera y segunda.
- 55 Despues se coloca la tercera capa sobre la segunda mezcla vaciada sobre la primera capa, antes de liofilizar la segunda mezcla, a fin de unir la segunda capa a las capas primera y tercera y proporcionar así una matriz de tres capas.
- 60 En un segundo ejemplo de una matriz de tres capas, la capa de tracción densa puede estar contenida dentro de dos capas externas de matriz de baja densidad. En esta realización, se vierte la tercera capa en forma de una dispersión, bien sea de manera independiente o bien directamente sobre los dos capas precedentes, y se une mediante un proceso de liofilización a la matriz interna. En este ejemplo, la tercera capa comprende preferiblemente un segundo conjunto no tejido de fibras de colágeno, que tiene una densidad de  $0,0001 \text{ mg/mm}^3$  a aproximadamente  $0,12 \text{ mg/mm}^3$  y un tamaño de poro de aproximadamente 50  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 150  $\mu\text{m}$ .
- 65 Preferiblemente, el colágeno utilizado en las matrices de la invención tiene una pureza de al menos aproximadamente 80%, está sustancialmente libre de toda contaminación por priones y vírica, tiene menos de 0,03 UE/g de endotoxinas, tiene un contenido de grasa no superior a 5%, tiene un contenido de hidroxiprolina de al menos 10%, y un contenido de cenizas no superior a 5%. Aunque actualmente se prefiere que el producto se derive de colágeno de dermis de bovino o de tendón de bovino, el colágeno puede obtenerse de otras fuentes que incluyen otros tejidos de bovino y tejidos de otros animales, entre ellos mamíferos no bovinos, animales no mamíferos y

animales transgénicos.

Además de colágeno, ciertas realizaciones de la matriz pueden incluir polímeros naturales y/o sintéticos para soporte estructural. Los polímeros deben ser biocompatibles y/o bio-reabsorbibles. Los polímeros adecuados incluyen, pero no se limitan a éstos, lactidas, glicolidas y sus copolímeros, policaprolactonas, poli(carbonato de etileno), poli(carbonatos de tirosina), poliácidos y polianhídridos de tirosina, biocompatibles y/o bio-reabsorbibles. El peso molecular del polímero se sitúa preferiblemente en aproximadamente 5000 a aproximadamente 500.000.

5 Ciertas realizaciones incluyen cantidades eficaces de factores de crecimiento tisular meníngeo y/o péptidos 10 bioactivos, tales como, por ejemplo, péptidos que contienen RGD, decorina, laminina, merosina, sulfato de condroitina, sulfato de dermatina, sulfato de heparano, sulfato de queratina, factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), fibronectina y otros ligandos de integrina, entactina y tenascina. En ciertas realizaciones, una cantidad eficaz de tal aditivo es aproximadamente 1 µg por mg de colágeno.

15 La matriz es preferiblemente no antigénica además de ser no infecciosa y fisiológicamente compatible.

La matriz es adecuada para reparar daños intencionados a los tejidos menígeos, tal como sucede en la cirugía, y daños consecutivos a los tejidos menígeos, tal como podría ocurrir a consecuencia de un traumatismo craneal accidental.

20 Tras una cirugía cerebral, la matriz de la presente invención es insertada para ocupar espacio dejado por la extirpación resultante de la cirugía. En cuanto a la reparación meníngea después de una craneotomía o una laminectomía, en particular con incisión a través de la duramadre, simplemente se puede implantar la matriz de la 25 presente invención en contacto con el defecto de la duramadre craneal o espinal creado por la cirugía. Además de simplemente poner en contacto con la matriz el tejido meníngeo dañado y el tejido adyacente no dañado (en particularmente cuando la matriz se utiliza como un sustituto de duramadre craneal), también se puede unir mecánicamente la matriz (por ejemplo, suturarlal) y/o unirla químicamente al tejido dañado y al tejido adyacente no dañado (por ejemplo, con pegamento de fibrina), especialmente si se utiliza en intervenciones en la base del cráneo o en cirugía espinal intradural.

30 Preferiblemente, la matriz conecta partes de tejido meníngeo no dañadas adyacentes al tejido meníngeo dañado, por superposición a estos tejidos no dañados. El tejido dañado puede haber sido, por ejemplo, rasgado, cortado, extirpado o lacerado, y puede estar situado, por ejemplo, en la duramadre espinal humana o en la duramadre 35 cerebral humana. El tejido meníngeo regenerado crece dentro de la matriz mientras la matriz permanece implantada dentro de un paciente. Es decir, la matriz actúa como un andamio para el crecimiento tisular, por ejemplo para el crecimiento tisular reparatorio.

40 Preferiblemente, la matriz es sustancialmente reabsorbida en el transcurso de unos tres meses después de su implantación. También se prefiere que la matriz sea reabsorbida a sustancialmente la misma velocidad que se forma tejido nuevo.

[0068] La invención será ilustrada con más detalle haciendo referencia a los siguientes Ejemplos, pero se entenderá que la presente invención no se debe considerar limitada a los mismos.

#### 45 **Ejemplos**

Ejemplo 1: Estudio de duroplastia en cerdo

50 Se llevó a cabo el siguiente procedimiento individualmente en cinco cerdos. Se realizó una durectomía bilateral en el seno frontal. Se crearon en la duramadre heridas izquierda y derecha sustancialmente idénticas, de dimensiones aproximadamente 1 x 2 cm cada una.

55 Una de las heridas durales fue reparada con una matriz de acuerdo con la presente invención. La matriz de la presente invención comprendía una lámina plana rígida, de color blanco, con dos texturas superficiales distintas, siendo una superficie lisa y estando la superficie opuesta cubierta con una multitud de proyecciones circulares de aproximadamente 1,25 mm de diámetro y 0,4-0,8 mm de altura. Al ser hidratada en solución salina normal, la matriz de la invención se hace flexible y se adapta fácilmente a la convexidad de los tejidos del cerebro y la duramadre expuestos. La matriz de la invención se aplicó como una superposición y se suturó a la duramadre adyacente con Nuralon 4-0.

60 La otra herida dural (el lado derecho en tres de los cinco cerdos) fue reparada con una matriz de la técnica anterior (DURAGEN PLUS, suministrada por Integra LifeSciences Corp., Plainsboro, NJ), que se aplicó como una superposición sin sutura.

65 La región del seno frontal fue reconstruida después de la implantación de las matrices. Los cerdos fueron sacrificados 90 días después de la intervención quirúrgica. Se comparó la curación de las heridas mediante la

inspección visual de la duramadre antes de extraer el cerebro del cráneo. Además, se diseccionaron el cerebro y la duramadre en la región de las heridas, se tiñeron y se montaron para el análisis microscópico.

- 5 La administración dural del material de matriz de la invención, suturado o superpuesto, durante aproximadamente 90 días en un modelo porcino dio como resultado la formación de un neo-duramadre, similar a la de DURAGEN PLUS. Al cabo de 90 días desde la aplicación, el grosor de la neo-duramadre regenerada después de la reparación del defecto dural con el dispositivo de la invención era aproximadamente dos tercios del espesor de la duramadre adyacente nativa. No se observaron reacciones adversas significativas asociadas con el material de prueba en los tejidos meníngeos o neurales adyacentes. La administración por superposición y suturada de los dispositivos de matriz de la invención fueron equivalentes a DURAGEN PLUS en su capacidad para regenerar neo-duramadre que abarcase el sitio de la duraplastia.
- 10

## REIVINDICACIONES

1. Una matriz para crecimiento tisular, comprendiendo dicha matriz:
  - una primera capa que comprende un primer conjunto de fibras de colágeno, en donde una superficie superior de la primera capa incluye al menos una proyección,
  - una segunda capa unida a una parte inferior de la primera capa y que comprende un segundo conjunto de fibras de colágeno, en donde la segunda capa tiene una densidad menor que la primera capa, y la al menos una proyección es menos densa y más porosa que las zonas adyacentes, y en donde:
    - 10 a) las proyecciones tienen un diámetro medio de 0,001-0,5 cm y una altura media de 0,001-0,2 cm, y en donde al menos una parte de la superficie superior de la primera capa tiene al menos una proyección por centímetro cuadrado, y en donde una superficie superior de la primera capa incluye poros que tienen tamaños de poro que abarcan de 10 µm a 250 µm, y una parte inferior de la primera capa tiene poros que tienen tamaños de poro que abarcan de 10 µm a 500 µm, y la segunda capa unida a una parte inferior de la primera capa comprende poros que tienen tamaños de poro que abarcan de 10 µm a 500 µm, siendo dichos poros eficaces para apoyar el crecimiento celular en la matriz;
    - 15 o bien
    - 20 b) una superficie superior de la primera capa incluye poros que tienen tamaños de poro que abarcan de 10 µm a 80 µm, y una parte inferior de la primera capa tiene poros que tienen tamaños de poro que abarcan de 80 µm a 250 µm, y la segunda capa unida a una parte inferior de la primera capa comprende poros que tienen tamaños de poro que abarcan de 10 µm a 500 µm;
    - 25 o bien
    - c) la primera capa tiene poros definidos por paredes de poro de primera capa, la segunda capa tiene poros definidos por paredes de poro de segunda capa, y los poros de primera capa son más pequeños que los poros de segunda capa, y las paredes de poro de primera capa son más gruesas que las paredes de poro de segunda capa.
2. La matriz según la reivindicación 1, opción a), en donde las proyecciones tienen un diámetro medio de 0,05-0,3 cm y una altura media de 0,02-0,2 cm.
- 30 3. La matriz según la reivindicación 1, opción a), en donde los primer y segundo conjuntos son no tejidos.
4. La matriz según la reivindicación 3, en donde al menos una parte de la superficie superior de la primera capa tiene al menos cinco proyecciones por centímetro cuadrado.
- 35 5. La matriz según la reivindicación 3, en donde las proyecciones se forman sobre la matriz comprimiendo una preforma de primera capa contra un molde que tiene una o más aberturas de drenaje en donde porciones de la superficie superior de la primera capa entran en las una o más aberturas de drenaje para formar las proyecciones y las aberturas de drenaje están dispuestas en el molde de manera tal que dichas proyecciones formadas sobre la matriz transmiten colectivamente información.
- 40 6. La matriz según la reivindicación 3, en donde la matriz es suficientemente flexible cuando está húmeda para ajustarse a una superficie de un tejido subyacente.
- 45 7. La matriz según la reivindicación 3, en donde la matriz está adaptada para adherirse al tejido subyacente sin ningún adhesivo añadido.
8. La matriz según la reivindicación 3, en donde la primera capa tiene una resistencia al desgarro en húmedo de al menos 1,5 N.
- 50 9. La matriz según la reivindicación 3, en donde la matriz es fisiológicamente compatible y está libre de virus y priones.
10. La matriz según la reivindicación 3, en donde la matriz está libre de adhesivos.
- 55 11. La matriz según la reivindicación 3, en donde dicha matriz es un objeto plano, los poros adyacentes a la superficie superior de la primera capa comprenden tamaños de poro que abarcan de 10 µm a 80 µm, los poros de la parte inferior de la primera capa comprenden tamaños de poro que abarcan de 80 µm a 250 µm, y los poros de la segunda capa comprenden tamaños de poro que abarcan de 50 µm a 150 µm.
- 60 12. La matriz según la reivindicación 11, en donde poros de la segunda capa próximos a una superficie inferior de la segunda capa son poros más externos que abarcan en tamaño de 30 µm a 150 µm y el resto de los poros de la segunda capa son poros más internos que abarcan en tamaño de 50 µm a 300 µm.
- 65 13. La matriz según la reivindicación 12, en donde los poros más externos tienen un tamaño de 70 µm y los poros más internos tienen un tamaño de 150 µm.

14. La matriz según la reivindicación 3, en donde los poros adyacentes a la superficie superior de la primera capa comprenden tamaños de poro que abarcan de 50 µm a 80 µm, los poros de la parte inferior de la primera capa comprenden tamaños de poro que abarcan de 80 µm a 120 µm, y los poros de la segunda capa comprenden tamaños de poro que abarcan de 50 µm a 150 µm.
- 5 15. La matriz según la reivindicación 3, en donde los poros adyacentes a la superficie superior de la primera capa comprenden tamaños de poro que abarcan de 10 µm a 250 µm, los poros de la parte inferior de la primera capa comprenden tamaños de poro que abarcan de 10 µm a 500 µm, y los poros de la segunda capa comprenden tamaños de poro que abarcan de 10 µm a 500 µm.
- 10 16. La matriz según la reivindicación 3, en donde la matriz está reticulada.
- 15 17. La matriz según la reivindicación 3, en donde las fibras de colágeno se obtienen mediante un procedimiento que comprende alcalinizar un material que contiene colágeno a un pH de 13 a 14 para eliminar glicoproteínas y lípidos contaminantes.
- 20 18. La matriz según la reivindicación 3, que comprende además una tercera capa que comprende un tercer conjunto no tejido de fibras de colágeno unido a una superficie inferior del segundo conjunto.
- 25 19. La matriz según la reivindicación 18, en donde la primera capa y la tercera capa son idénticas.
- 20 20. La matriz según la reivindicación 3, en donde los poros de la superficie superior de la primera capa comprenden tamaños de poro de 10 µm a 250 µm y poros de la parte inferior de la primera capa comprenden tamaños de poro de 10 µm a 500 µm, y en donde la primera capa tiene una densidad de 0,005 mg/mm<sup>3</sup> a 0,4 mg/mm<sup>3</sup> y la segunda capa tiene una densidad de 0,001 mg/mm<sup>3</sup> a 0,12 mg/mm<sup>3</sup>, permitiendo la infiltración por fluidos de la herida y coágulos de fibrina.
- 30 21. La matriz según la reivindicación 1, opción b), en donde los poros de la segunda capa tienen tamaños de poro que abarcan de 50 µm a 150 µm.
- 35 22. La matriz según la reivindicación 1, opción b), en donde al menos una parte de la superficie superior de la primera capa tiene al menos una proyección por centímetro cuadrado.
23. La matriz según la reivindicación 1, opción b), en donde al menos una parte de la superficie superior de la primera capa tiene al menos cinco proyecciones por centímetro cuadrado.
- 30 24. La matriz según la reivindicación 1, opción c), en donde al menos una parte de la superficie superior de la primera capa tiene al menos una proyección por centímetro cuadrado.
- 40 25. La matriz según la reivindicación 1, opción c), en donde al menos una parte de la superficie superior de la primera capa tiene al menos cinco proyecciones por centímetro cuadrado.
26. La matriz según la reivindicación 1, opción c), en donde los poros adyacentes a la superficie superior de la primera capa comprenden tamaños de poro que abarcan de 10 µm a 250 µm, los poros de la parte inferior de la primera capa comprenden tamaños de poro que abarcan de 10 µm a 500 µm, y los poros de la segunda capa comprenden tamaños de poro que abarcan de 10 µm a 500 µm.
- 45 27. La matriz según la reivindicación 1, opción c), en donde los poros adyacentes a la superficie superior de la primera capa comprenden tamaños de poro que abarcan de 50 µm a 80 µm, los poros de la parte inferior de la primera capa comprenden tamaños de poro que abarcan de 80 µm a 120 µm, y los poros de la segunda capa comprenden tamaños de poro que abarcan de 50 µm a 150 µm.
- 50 28. Un método para proporcionar la matriz para crecimiento tisular según la reivindicación 1, comprendiendo dicha matriz:
- 55 una primera capa que comprende un primer conjunto de fibras de colágeno; una pluralidad de proyecciones sobre una superficie superior de la primera capa, en donde las proyecciones tienen un diámetro medio de 0,001-0,5 cm y una altura media de 0,001-0,2 cm, y en donde al menos una parte de la superficie superior de la primera capa tiene al menos una proyección por centímetro cuadrado; y
- 60 una segunda capa unida a una parte inferior de la primera capa y que comprende un segundo conjunto de fibras de colágeno, en donde la segunda capa tiene una densidad menor que la primera capa, y la matriz comprende poros eficaces para apoyar el crecimiento celular en la matriz, y las proyecciones son menos densas y más porosas que las zonas adyacentes; comprendiendo dicho método:
- 65 proporcionar una primera mezcla de fibras de colágeno y un primer vehículo líquido; vaciar la primera mezcla en un primer molde;

drenar a través del primer molde una cantidad inicial del primer vehículo líquido para proporcionar una preforma de primera capa;

congelar la preforma de primera capa para proporcionar una preforma de primera capa congelada;

descongelar la preforma de primera capa congelada para proporcionar una preforma de primera capa descongelada;

5 comprimir la preforma de primera capa descongelada contra el primer molde para drenar a través del primer molde una cantidad adicional del primer vehículo líquido para proporcionar la primera capa;

proporcionar una segunda mezcla de fibras de colágeno y un segundo vehículo líquido;

vaciar la segunda mezcla sobre la primera capa; y

10 liofilizar la segunda mezcla sobre la primera capa para proporcionar la segunda capa sobre la primera capa y de ese modo proporcionar la matriz.

29. El método según la reivindicación 28, en donde los primer y segundo vehículos líquidos son agua y las primera y segunda mezclas son dispersiones.

15 30. El método según la reivindicación 28, en donde en el paso de compresión de la primera capa se drena fluido de la preforma de primera capa comprimiéndola contra un molde que tiene una o más aberturas de drenaje.

31. El método según la reivindicación 28, en donde las fibras de colágeno se obtienen por alcalinización de un material que contiene colágeno, a un pH de 13 a 14 para eliminar glicoproteínas y lípidos contaminantes.

20 32. El método según la reivindicación 28, en donde dicha matriz es un objeto plano, los poros adyacentes a la superficie superior de la primera capa comprenden tamaños de poro que abarcan de 10 µm a 80 µm, los poros de la parte inferior de la primera capa comprenden tamaños de poro que abarcan de 80 µm a 250 µm, y los poros de la segunda capa comprenden tamaños de poro que abarcan de 50 µm a 150 µm.

25 33. El método según la reivindicación 28, que comprende además:  
proporcionar una tercera mezcla de fibras de colágeno y un tercer vehículo líquido;  
vaciar la tercera mezcla en un segundo molde;  
drenar a través del segundo molde una cantidad inicial del tercer vehículo líquido para proporcionar una preforma de tercera capa;  
30 congelar la preforma de tercera capa para proporcionar una preforma de tercera capa congelada;  
descongelar la preforma de tercera capa congelada para proporcionar una preforma de tercera capa descongelada;  
comprimir la preforma de tercera capa contra el segundo molde para drenar a través del segundo molde una cantidad adicional del tercer vehículo líquido para proporcionar la tercera capa;  
35 colocar la tercera capa sobre la segunda mezcla vaciada sobre la primera capa antes de liofilizar la segunda mezcla, con el fin de unir la segunda capa a la primera capa y la tercera capa y de ese modo proporcionar una matriz de tres capas.

Figura 1

