

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 088**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

A61L 27/36 (2006.01)

A61K 35/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2003 E 03745621 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.09.2014 EP 1575572**

54 Título: **Biotejido de colágeno y métodos de preparación y uso del mismo**

30 Prioridad:

26.03.2002 US 106653

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

05.01.2015

73 Titular/es:

**ANTHROGENESIS CORPORATION (100.0%)
7 Powder Horn Drive
Warren NJ 07059, US**

72 Inventor/es:

**HARIRI, ROBERT J.;
KAPLUNOVSKY, ALEKSANDR M. y
MURPHY, PATRICIA A.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 526 088 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

Biotejido de colágeno y métodos de preparación y uso del mismo

1. Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método para preparar un laminado de membrana amniótica a partir de una placenta que tiene una membrana amniótica y una membrana coriónica. La presente invención también se refiere a un laminado de membrana amniótica, que se puede obtener con el método de la presente invención.

10 La presente invención comprende membranas de colágeno producidas a partir del amnios, denominado en el presente documento biotejido de colágeno. El biotejido de colágeno comprendido en la invención tiene la integridad estructural de la membrana amniótica sin tratar nativa, es decir, la estructura terciaria y cuaternaria nativa. La presente divulgación proporciona un método para preparar un biotejido de colágeno a partir de membrana de placenta, preferentemente una membrana de placenta humana que tiene una membrana coriónica y amniótica, por descelularización de la membrana amniótica. En una realización precedente, la membrana amniótica está completamente descelularizada. El biotejido de colágeno comprendido en la invención tiene numerosos usos en el campo médico y quirúrgico incluyendo, por ejemplo, reparación de vasos sanguíneos, construcción y sustitución de un vaso sanguíneo, sustitución de tendones y ligamentos, vendaje de heridas, injertos quirúrgicos, usos oftálmico, suturas y otros. Los beneficios del biotejido se deben, en parte, a sus propiedades físicas tales como resistencia biomecánica, flexibilidad, capacidad de sutura, y baja inmunogenicidad, particularmente cuando se deriva de placenta humana.

2. Antecedentes de la invención

20 2.1 MEMBRANA AMNIÓTICA: ANATOMÍA E HISTOLOGÍA

El saco placentario está formado por dos capas conectadas estrechamente mediante tejido conjuntivo flexible. Se conocen como las capas amniótica y coriónica (Véase la FIGURA 1). La capa amniótica es la más interna de las dos capas y entra en contacto con el fluido amniótico que rodea al feto y en conjunto forman el saco amniótico. La capa amniótica es avascular y está revestida con epitelio columnar sencillo que recubre una membrana basal y tiene un espesor de 30-60 micrómetros. La membrana coriónica es la capa más externa del saco y está muy celularizada. El árbol vascular se origina en la placenta y se extiende a las membranas de la placenta a través de la capa coriónica. La capa coriónica se separa de la capa amniótica mediante tejido colector flexible y combinadas, las dos capas miden 120-180 micrómetros. Las membranas de la placenta tienen una matriz de colágeno que está muy cargada de mucopolisacáridos y se cree que sirven principalmente como un saco protector para el feto en desarrollo. Las membranas también mantienen una barrera para agentes infecciosos e inmunológicos presentes en la circulación materna. Las membranas de la placenta tienen medios de transporte tanto activos como pasivos. La mayoría de las moléculas pequeñas y proteínas pueden viajar libremente a través de ellos, pero las proteínas grandes como IgM no pueden cruzar a través de la capa basal.

35 La conservación de las membranas de la placenta (que son de fuentes animales o humanas) en alcohol etílico al 95 % o glicerol mezclados en proporciones de un 50-50 % con medios de cultivo tisular se ha usado para la conservación de la membrana amniótica antes de su congelación. Estos conservantes eliminan la vitalidad de los tejidos de placenta haciendo los núcleos piknóticos pero la matriz de colágeno y las membranas basales se conservan. De forma interesante, ambas formas de conservación también eliminan la antigenicidad de las membranas trasplantadas y también cualquier agente potencialmente virulento. La conservación nuevamente se consigue después de que las membranas amnióticas se separen cuidadosamente del corión. El lado de la membrana amniótica con la lámina y epitelio basales es brillante y el lado opuesto frente al corión no tiene brillo.

2.2 APLICACIONES CLÍNICAS PREVIAS DE MEMBRANAS AMNIÓTICAS

45 Los posibles problemas potenciales con tejidos xenogénicos (tejidos de otras especies) que transportan enfermedades zoonóticas o que causan rechazo entre especies han hecho estos tejidos menos deseables. Los injertos alogénicos, o injertos de diferentes individuos de la misma especie, siguen siendo la fuente preferente de materiales para injerto en seres humanos. La escasez de tejidos de donantes humanos para injerto es un problema creciente que ha estimulado el desarrollo de nuevos materiales para injerto de tejido. Muy a menudo estas fuentes de material biológico de partida son escasas, difíciles de obtener, y con un coste muy elevado. Sin embargo, la lámina de colágeno de amnios humano tiene características biomecánicas deseables útiles en aplicaciones de injerto de tejido. Por lo tanto, las membranas amnióticas son una buena fuente de material de injerto alogénico.

55 La membrana fetal que incluye la membrana amniótica y coriónica se ha usado en cirugías documentadas ya en 1910 y ha sido revisada por Trelford y Trelford-Sauder en 1979 (Véase Trelford y Trelford-Sauder, 1979, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 833). En 1910, Davis fue el primero en informar del uso de membranas fetales como un material quirúrgico en trasplante de piel, por ejemplo en pieles quemadas y ulceradas (Davis *et al.*, 1910, *Johns Hopkins Med. J.*; 15: 307). Estos estudios se realizaron principalmente en animales y los ensayos en seres humanos fueron decepcionantes. Desde entonces, se ha desarrollado el uso de membranas amnióticas en cirugía (Véase, por ejemplo, Stem *et al.*, 1913, *JAMA*, 13: 973-4; Sabella *et al.*, 1913 *Med. Records NY*, 83: 478-80; de Rotth *et al.*, 1940

Arch. Ophthalmol, 23: 522-5; Sorsby *et al.*, 1946, *Br. J. Ophthalmol.* 30: 337-45). En la actualidad se usa como un apósito biológico para piel quemada, heridas en la piel, y úlceras crónicas en las piernas, como un tejido adyuvante en la reconstrucción quirúrgica de vagina artificial, y para la reparación de onfaloceles (Véase por ejemplo, Trelford y Trelford-Sauder, 1979, 134 *Am. J. Obstet. Gynecol.* 833; Colucho *et al.*, 1974 *Arch. Surg.* 109: 370-3; Faulk *et al.* 1980 *Lancet*, 1156; Prasad *et al.*, 1986, *J. Trauma*, 26: 945-6; Subrahmanyam *et al.*, 1995, *J. Plastic Surg.* 48: 477-8; Gruss *et al.*, 1978, *J. Can. Med. Assoc.* 118: 1237-46; Ward *et al.*, 1984, *Br. J. Plastic Surg.* 37: 191-3; Dhall, 1984, *J. Obstet. Gynaecol.* 91: 279-82). También sea usado para prevenir la adherencia de tejido en procedimientos quirúrgicos del abdomen, cabeza y pelvis (Gharib *et al.*, 1996, *Pediatr. Surg. Int.* 11: 96-9; Rennekampff *et al.*, 1994, *Invest. Surg.* 7: 187-93). En la década de 1940, varios autores informaron del papel beneficioso de la membrana amniótica en el tratamiento de una diversidad de trastornos de la superficie ocular (Véase por ejemplo, de Rotth *et al.*, 1940 *Arch. Ophthalmol*, 23: 522-5; Sorsby *et al.*, 1946, *Br. J. Ophthalmol.* 30: 337-45; Lavery *et al.*, 1946, *Trans. Ophthalmol. Soc. UK*, 66: 668).

Anteriormente se han descrito numerosos intentos en el campo para optimizar la preparación y conservación de las membranas amnióticas para uso en trasplante (véase por ejemplo, Dua *et al.*, 1999, *Br. J. Ophthalmol* 83: 748-52 ("Dua") para una revisión). Diversas preparaciones de membranas amnióticas han incluido conservación con mezclas de solución salina y antibiótico, deshidratación con alcohol con o sin separación de la capa amniótica de la capa coriónica. Sin embargo, todos los métodos que se describen en Dua, y en las referencias que se han descrito anteriormente aún presentan deficiencias que es necesario abordar mediante mejoras en la preparación y conservación de las membranas amnióticas.

Más recientemente, se han desvelado métodos que dependen de la congelación para la conservación de la membrana amniótica para su aplicación en procedimientos quirúrgicos de injerto de tejido para corregir defectos epiteliales de la córnea. Véanse por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 6.152.142 y N° 6.326.019B1 ("Tseng"). Tseng desvela una membrana amniótica que está montada sobre un sustrato y se conserva en una mezcla de Medio de Eagle modificado con Dulbecco y glicerol y se congela a -80 °C. El proceso de congelación del tejido en cualquier momento durante su preparación hace que la membrana amniótica de Tseng sea frágil, e incluso más frágil después de las etapas de descongelación y activación. Además, las etapas de descongelación y activación añaden tiempo necesario para la manipulación de la membrana amniótica. Además, debido a la fragilidad de la membrana amniótica de Tseng causada por la etapa de congelación en el proceso de conservación y preparación, se requiere un soporte o apoyo estructural para garantizar la integridad estructural de la membrana amniótica de Tseng durante el almacenamiento. Esto presenta la dificultad añadida de separar la membrana amniótica conservada del respaldo, el cual, debido a su fragilidad, puede ser difícil de manipular y separar intacto. La separación de la membrana amnios del soporte aumenta de este modo la probabilidad de ruptura de la membrana, y aumenta el periodo de tiempo necesario para activar la membrana amniótica para permitir la impregnación a fondo de la solución de activación en la membrana amniótica congelada antes de realizar el procedimiento quirúrgico, lo que conduce al aumento del tiempo de preparación en la sala de cirugía. El almacenamiento y el transporte también se complican por la necesidad de congelación a - 80 °C. Por último, las membranas de Tseng por lo general no están descelularizadas; como resultado, las membranas amnióticas preparadas de este modo por lo general son opacas y no tienen una composición estructural uniforme.

Más recientemente, Yui *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 5.618.312, (la "Patente 312") describió la preparación de láminas de colágeno a partir de estrato compacto de la membrana de tejido. Aunque el material descrito es principalmente colágeno, es lo suficientemente débil debido a su procesamiento para requerir una etapa separada de reticulación con el fin de hacer que sea lo suficientemente resistente como para uso médico, por ejemplo, que se pueda suturar. En la Patente 312 se describe un método para reticulación que usa el tratamiento a alta temperatura, preferentemente de 100 ° a 110 °C, el cual se cree que afecta de forma adversa a la conformación nativa del colágeno. Yui *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 5.876.451 describe un material de colágeno similar obtenidos a partir de placenta. Este material, sin embargo, se trata durante la preparación con proteasas como parte de una etapa de descelularización, lo que probablemente tal como resultado la destrucción y/o interrupción de la conformación nativa de los componentes de la matriz; por lo tanto, la matriz de colágeno resultante no mantiene su conformación nativa.

Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de una membrana amniótica mejorada para uso en aplicaciones médicas, de diagnóstico, y cosméticas, que tenga mejores características estructurales. La presente invención proporciona tal biotejido, que comprende colágeno que, a diferencia de los biotejidos a base de colágena anteriores, mantiene la estructura cuaternaria del colágeno nativo. Como resultado, el biotejido de la presente invención se prepara fácilmente, se usa fácilmente, y es lo suficientemente resistente para fines médicos y quirúrgicos, y proporciona un sustrato para la curación de heridas.

3. Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un método para preparar un laminado de membrana amniótica a partir de una placenta que tiene una membrana amniótica y una membrana coriónica que comprende: (a) separar la membrana amniótica de la membrana coriónica; (b) descelularizar la membrana amniótica; y (c) formar capas de al menos dos de las membranas amnióticas descelularizadas en contacto entre sí de modo que se forma un laminado de membrana amniótica, en el que la descelularización de la membrana amniótica no forma congelación en ningún

punto en la preparación de la membrana amniótica o en la puesta de contacto de la membrana con proteasa.

Además, la presente invención se refiere a un laminado de membrana amniótica que comprende al menos dos capas de una membrana amniótica deshidratada, descelularizada, y libre de sustrato, en el que dicha membrana amniótica tiene una estructura terciaria y cuaternaria nativa.

5 La presente invención se refiere, en parte, al descubrimiento por los inventores de un nuevo método de preparación de un biotejido de colágeno a partir de placenta, preferentemente una placenta humana, que da como resultado un nuevo biotejido de colágeno con mejores propiedades físicas y biofísicas. Preferentemente el método de la preparación implica una manipulación mínima de la membrana amniótica. El biotejido de colágeno comprendido en la invención, a diferencia de los que se describen en la técnica anterior, debido a la forma mediante la que se
10 procesa, tiene una estructura terciaria y cuaternaria nativa intacta. La presente invención también proporciona una membrana amniótica o biotejido derivados de placenta que tienen características superiores de aumento de la resistencia a la tracción, capacidad de sutura, e inmunogenicidad reducida que da como resultado una reducción del rechazo de huésped-injerto. La presente invención también proporciona una membrana amniótica o biotejido derivados de placenta que se pueden almacenar como láminas deshidratadas sin congelación ni criopreservación.
15 Preferentemente, la membrana amniótica derivada de placenta se deriva de una placenta humana para uso en pacientes humanos. Sin embargo, se pueden usar los mismos métodos usando placentas de diversas especies animales para uso veterinario en pacientes animales.

La presente divulgación proporciona un método para preparar un biotejido de colágeno que comprende proporcionar una placenta, preferentemente una placenta humana, separar las capas amniótica y coriónica la una de la otra, y
20 descelularizar la membrana amniótica a la vez que se conserva la arquitectura de la matriz extracelular subyacente. El método también implica el lavado y el secado de la membrana descelularizada. Este método proporciona un biotejido deshidratado, descelularizado que puede permanecer estable en condiciones estériles de almacenamiento a temperatura ambiente y que posteriormente se vuelve a hidratar y se injerta a o se implanta en un sujeto.

En una realización específica, la placenta es de una hembra humana que se ha sometido a un parto de sección por
25 cesárea o un parto natural. En realizaciones preferentes, se usan ensayos serológicos y bacteriológicos comunes para un experto en la materia para determinar si la placenta es de un donante que está libre de una enfermedad de transmisión. En una realización específica, la placenta se ha sometido a ensayo para saber si está libre de al menos una enfermedad de transmisión. En otra realización, se conoce la fuente de la placenta, incluyendo historia médica, tipo sanguíneo, datos inmunológicos, y características del genotipo del donante. Aunque la placenta puede ser de cualquier mamífero, el donante es preferentemente una hembra humana. En algunas realizaciones, la placenta se desangra usando métodos comunes conocidos por un experto en la materia antes de separar la membrana amniótica de la membrana coriónica.
30

La descelularización de la membrana amniótica de acuerdo con los métodos de la invención comprende retirar todo el material celular visible y residuos celulares de la membrana amniótica, por ejemplo, a partir del lado materno de la
35 membrana amniótica y del lado fetal de la membrana amniótica. La descelularización de la membrana amniótica no debería dar como resultado la alteración de la integridad estructural de la membrana amniótica ni alterar la composición bioquímica. Por consiguiente, la descelularización de la membrana amniótica de acuerdo con los métodos de la invención no forma congelación en ningún punto en la preparación de la membrana amniótica o en la puesta de contacto de la membrana con una proteasa.

40 Preferentemente, la membrana amniótica se descelulariza usando una solución que contiene un detergente débil, por ejemplo, una solución que comprende monohidrato de sal sódica del ácido desoxicólico al 0,01-1,0 %, un detergente no iónico, Triton X-100, un detergente aniónico, o dodecil sulfato sódico o a una combinación de los mismos.

Una vez que la membrana amniótica se descelulariza de acuerdo con los métodos de la invención, la membrana se
45 puede lavar y secar, preferentemente con poco calor al vacío.

En algunas realizaciones, la invención comprende un biotejido de colágeno que comprende una membrana amniótica deshidratada, descelularizada y libre de sustrato, de modo que la membrana tiene una estructura terciaria y cuaternaria nativa. En otras realizaciones, la invención comprende un biotejido de colágeno que comprende una membrana amniótica descelularizada libre de sustrato, que comprende colágeno, elastina y fibronectina. Además, en
50 otras realizaciones, la invención comprende un biotejido de colágeno que comprende una membrana amniótica deshidratada, descelularizada, uniforme, translúcida, y libre de sustrato, con la condición de que la membrana amniótica nunca haya estado en contacto con una proteasa.

En algunas realizaciones, el biotejido comprende adicionalmente una o más biomoléculas, por ejemplo, agentes
55 terapéuticos, que incluyen, pero no se limitan a, antibióticos, hormonas, factores de crecimiento, agentes antitumorales, agentes antifúngicos, agentes antivirales, medicamentos para el dolor, antihistamínicos, agentes antiinflamatorios, agentes antiinfecciosos, agentes para curación de heridas, selladores de heridas, atractores celulares y reactivos para formación de armazones, y similares. En un ejemplo específico, el biotejido de colágeno puede estar impregnado con uno o más factores de crecimiento, por ejemplo, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento epitelial, etc. El biotejido también se puede impregnar con una o más moléculas pequeñas, que
60 incluyen, pero no se limitan a moléculas orgánicas pequeñas tales como inhibidores específicos de procesos bioquímicos en particular, por ejemplo, inhibidores de receptores de membrana, inhibidores de quinasas, inhibidores

del crecimiento, fármacos anticáncer, antibióticos, etc. En algunas realizaciones, el biotejido de colágeno se impregna con una biomolécula, durante la producción o durante la preparación para la cirugía dependiendo de su uso pretendido.

5 En algunas realizaciones, la invención incluye un laminado que comprende al menos dos capas del biotejido de la invención, y métodos para preparar el mismo. En otras realizaciones, la invención incluye dar forma a los laminados en armazones tridimensionales complejos dependiendo del uso pretendido, que incluyen, pero no se limitan a láminas, fibras, esferas, tubos.

10 En una realización, la invención incluye un método para preparar un laminado de membrana amniótica que comprende: proporcionar una placenta que comprende una membrana amniótica y una membrana coriónica; separar la membrana amniótica de la membrana coriónica; y descelularizar la membrana amniótica. En otra realización, el método comprende adicionalmente lavar la membrana amniótica descelularizada al menos una vez; formar capas de al menos dos de las membranas amnióticas descelularizadas en contacto entre sí de modo que se forma un laminado de membrana amniótica; y secar el laminado de membrana amniótica descelularizada. Como alternativa, en otra realización, el método para preparar un laminado de membrana amniótica comprende, secar al menos dos membranas amnióticas preparadas de acuerdo con los métodos de la invención, y formar capas de al menos dos membranas amnióticas en contacto entre sí de modo que se forma un laminado de membrana amniótica.

20 En algunas realizaciones, las capas de membrana amniótica producidas de acuerdo con los métodos de la invención separen colocar en contacto entre sí en presencia de un adhesivo para formar un laminado de membrana amniótica. El adhesivo usado de acuerdo con los métodos y composiciones de la invención puede ser cualquier pegamento biológico conocido por un experto en la materia, preferentemente un pegamento biocompatible, incluye, pero no se limita a, pegamento natural, por ejemplo, fibronectina, fibrina, pegamento sintético. En otras realizaciones, las capas de membrana amniótica preparadas de acuerdo con los métodos de la invención están reticuladas entre sí para formar un laminado de membrana amniótica. Cualquier reactivo y método de reticulación conocido por un experto en la materia está dentro del alcance de la presente invención, e incluyen, pero no se limitan a, reticulación química, reticulación peptídica, reticulación por UV, reticulación por radiación, reticulación con fibronectina, reticulación con fibrinógeno, reticulación con hidrogel. En otras realizaciones, el laminado de membranas amnióticas producido de acuerdo con los métodos de la invención no comprende un adhesivo.

25 Para referencia solamente, la presente divulgación incluye el uso del biotejido de colágeno en forma de un injerto quirúrgico o el uso del injerto quirúrgico en un procedimiento quirúrgico en un sujeto, preferentemente un ser humano, que comprende colocar el injerto directamente en el sitio quirúrgico.

30 La invención proporciona un laminado de membrana amniótica, o un armazón tridimensional que comprende adicionalmente una o más composiciones de hidrogel, y métodos para preparar los mismos. La composición de hidrogel debe comprender un polímero que incluye, pero no se limita a alcohol de polivinilo, polietilenglicol, ácido hialurónico, y derivados y análogos de los mismos.

35 En algunas realizaciones, el biotejido de colágeno comprendido en la invención, laminados, armazones tridimensionales, o composiciones de hidrogel del mismo se pueden poblar adicionalmente con células, tales como células madre, células adultas diferenciadas, células precursoras, y similares, preferentemente humanas de modo que las células sean uniformes y confluentes. Las células no tienen su origen en embrión humano.

40 En el presente documento se desvelan métodos de producción de alto nivel del biotejido de colágeno, laminados del mismo, armazones tridimensionales del mismo y composiciones de hidrogel del mismo, en particular pero no limitados a, producción a escala comercial. La invención resuelve las dificultades de la producción de cantidades a gran escala de membranas amnióticas para uso en ensayos clínicos y ventas comerciales.

45 En el presente documento se desvelan composiciones que comprenden un biotejido de colágeno que se desvela en el presente documento adecuadas para administración de fármacos; ingeniería de tejidos; usos relacionados con la urología, por ejemplo, corrección de la incontinencia urinaria; usos oculares, por ejemplo, para el tratamiento de un trastorno de la superficie ocular, y como un injerto quirúrgico oftálmico; usos vasculares, por ejemplo, reparación de vasos sanguíneos, construcción y sustitución de un vaso sanguíneo; usos cardiológicos, por ejemplo, en forma de un dispositivo protésico en la construcción de válvulas dañadas; usos relacionados con las neuronas, por ejemplo, preparación de nervios dañados, especialmente nervios periféricos anulados, como un sustituto dural, y como una prótesis alrededor de la anastomosis del nervio; usos relacionados con los huesos, por ejemplo, para el tratamiento de defectos ortopédicos, como un sustituto óseo; usos dermatológicos, por ejemplo, para el tratamiento de heridas (externas e internas), heridas agudas y crónicas, heridas congénitas, y quemaduras; para el tratamiento de afecciones cutáneas, por ejemplo, lesiones cutáneas, envejecimiento de la piel, arrugas, líneas finas, adelgazamiento, reducción de la elasticidad de la piel, piel áspera, y piel dañada por el sol; en forma de un apósito para heridas; y para el tratamiento de infecciones de heridas.

55 En el presente documento se desvela un método para tratar y/o prevenir una enfermedad o trastorno relacionados con los ojos, por ejemplo, enfermedad de la superficie ocular, en un sujeto, que comprende el uso del biotejido de colágeno que se desvela en el presente documento, por ejemplo, colocando el biotejido como un injerto quirúrgico

5 en la superficie dañada de la córnea del sujeto o un método para tratar y/o prevenir una afección cutánea en un sujeto, que comprende el uso de un biotejido de la invención, por ejemplo, al poner en contacto la piel con el biotejido o tratar una herida y/o quemadura en un sujeto que comprende poner en contacto la herida y/o quemadura con un biotejido de la invención o un método para corregir la incontinencia urinaria en un sujeto, preferentemente, un ser humano, que comprende el uso de un biotejido de colágeno en forma de un implante.

En el presente documento se desvela un método para administrar un agente terapéutico a un sujeto que comprende poner en contacto el sujeto con un biotejido de colágeno que se desvela en el presente documento o métodos para administrar células a un sujeto que comprende poblar un biotejido o laminado de colágeno de la invención con células vivas por ejemplo en ingeniería de tejidos.

10 En el presente documento se desvela un injerto quirúrgico que comprende el biotejido de la invención para uso en un procedimiento quirúrgico. El injerto quirúrgico se puede aplicar a un sitio interno o externo del sujeto, preferentemente un ser humano.

4. Breve descripción de las figuras

FIGURA 1 La membrana coriónica y amniótica de una placenta humana.

15 **FIGURA 2 FOTOMICROGRAFÍA DEL BIOTEJIDO DE COLÁGENO**
A. ANTES DE SU PROCESAMIENTO
B. DESPUÉS DE SU PROCESAMIENTO

FIGURA 3 EL BIOTEJIDO DE COLÁGENO. A modo de ejemplo, el biotejido de colágeno comprendido en la invención tiene una superficie translúcida uniforme con un patrón en relieve.

20 **FIGURA 4 MARCO DE MALLA Y EL BIOTEJIDO QUE SE ESTÁ SECANDO EN EL MISMO**

5. Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un método para preparar un laminado de membrana amniótica a partir de una placenta que tiene una membrana amniótica y una membrana coriónica que comprende: (a) separar la membrana amniótica de la membrana coriónica; (b) descelularizar la membrana amniótica; y (c) formar capas de al menos dos de las membranas amnióticas descelularizadas en contacto entre sí de modo que se forma un laminado de membrana amniótica, en el que la descelularización de la membrana amniótica no forma congelación en ningún punto en la preparación de la membrana amniótica o en la puesta de contacto de la membrana con proteasa.

25 Además, la presente invención se refiere a un laminado de membrana amniótica que comprende al menos dos capas de una membrana amniótica deshidratada, descelularizada, y libre de sustrato, en el que dicha membrana amniótica tiene una estructura terciaria y cuaternaria nativa.

30 La presente invención proporciona una membrana o biotejido de colágeno derivado de la placenta de un mamífero, preferentemente de un ser humano. El biotejido de colágeno se prepara para que mantenga la conformación nativa del colágeno, es decir, la conformación terciaria y cuaternaria nativa, en el producto final. Además del biotejido de colágeno, en el presente documento se desvelan métodos para preparar el biotejido de colágeno, y para usar el biotejido en una instalación médica.

La presente invención comprende un biotejido de colágeno que comprende una membrana amniótica deshidratada, descelularizada y libre de sustrato de modo que la membrana amniótica tenga una estructura terciaria y cuaternaria nativa. En algunas realizaciones, la invención comprende un biotejido de colágeno descelularizado y libre de sustrato que comprende colágeno, elastina, y fibronectina.

40 En algunas realizaciones, la invención proporciona un laminado de membrana amniótica que comprende un biotejido de colágeno tal como se desvela en el presente documento. El laminado de membrana amniótica preparado de acuerdo con los métodos de la invención comprende al menos dos capas del biotejido de colágeno que se colocan en contacto entre sí para formar el laminado de membrana amniótica. En otras realizaciones, la invención comprende un armazón tridimensional, tal como un tubo, que comprende un biotejido de colágeno tal como se desvela en el presente documento. Además, en otras realizaciones, la invención comprende un biotejido de colágeno tal como se desvelan el presente documento, un laminado del mismo, o un armazón tridimensional del mismo que comprende adicionalmente una composición de hidrogel.

50 Por lo tanto, la invención comprende diversas formas y configuraciones del biotejido de colágeno que incluyen, pero no se limitan a laminados, armazones tridimensionales, y composiciones de hidrogel. En el presente documento se desvela cualquier forma útil en medicina de las composiciones de la invención. Independientemente de la forma o configuración en particular, las composiciones de invención pueden comprender adicionalmente una o más biomoléculas, preferentemente un agente terapéutico. Las composiciones de la invención que comprenden una biomolécula tienen numerosos usos en el campo médico tal como se describe con detalle en el presente documento. En algunas realizaciones, la invención incluye la población de las composiciones de la invención con células vivas con el fin de que las células sean uniformes y confluentes. Las composiciones de la invención poblada son células 55 tienen numerosos usos en el campo médico y dental para fines de ingeniería de tejidos.

En el presente documento se desvelan métodos para preparar un biotejido de colágeno, un laminado del mismo, un armazón tridimensional del mismo, o una composición de hidrogel. En el presente documento se desvela un método para preparar un biotejido de colágeno a partir de una placenta que tiene una membrana amniótica y una membrana coriónica que comprende: separar la membrana amniótica de la membrana coriónica; y descelularizar la membrana amniótica con el fin de que la membrana amniótica no esté en contacto con un enzima, por ejemplo, una proteasa. El método implica adicionalmente lavar y secar la membrana amniótica descelularizada. En otra realización específica, la invención proporciona un método para preparar un laminado de membrana amniótica a partir de una placenta que tiene una membrana amniótica y una membrana coriónica que comprende: separar la membrana amniótica de la membrana coriónica; descelularizar la membrana amniótica; y formar capas de al menos dos de las membranas amnióticas descelularizadas en contacto entre sí de modo que se forme en laminado de membrana. En una realización específica, la membrana amniótica descelularizada se seca antes de formar la capa. En otra realización específica, la membrana amniótica descelularizada se seca después de que se forme la capa de modo que al menos dos de las membranas amnióticas descelularizadas están en contacto entre sí.

En el presente documento se desvela un método para usar el biotejido de colágeno de la invención, laminados del mismo, armazones tridimensionales del mismo, o composiciones de hidrogel del mismo en una instalación médica, dental y quirúrgica. De hecho, se espera que las composiciones de la invención tengan un aumento de la utilidad terapéutica y clínica con respecto a los otros biomateriales conocidos en la técnica. En el presente documento se desvela un método para tratar y/o prevenir una enfermedad o trastorno relacionados con los ojos en un sujeto usando una composición de la invención o un método para tratar y/o prevenir una enfermedad o trastorno relacionados con los ojos en un sujeto que comprende colocar el biotejido en una superficie del ojo enfermo del sujeto.

En el presente documento se desvela un método para tratar y/o prevenir una afección cutánea en un sujeto, preferentemente un ser humano, usando una composición de la invención. El método comprende poner en contacto la piel del sujeto con la composición. Como alternativa, la composición se coloca directamente en la superficie de la piel del sujeto, que es el sitio de la afección cutánea.

En el presente documento se desvela un método para tratar una herida o una quemadura en un sujeto, preferentemente un ser humano, que comprende poner en contacto la composición en el sitio de la herida o quemadura.

En el presente documento se desvela el uso de una composición de la invención (por ejemplo, un biotejido de colágeno, un laminado de membrana amniótica) en un procedimiento quirúrgico, tal como cirugía oftálmica; cirugía cardiovascular; cirugía periodontal; cirugía neurológica, cirugía dental, y cirugía.

En el presente documento se desvela un método para usar una composición de la invención para administrar una biomolécula, preferentemente un agente terapéutico a un sujeto, preferentemente un ser humano. En el presente documento se desvela un método para administrar células usando una composición de la invención a un sujeto, preferentemente un ser humano, en el que la composición se ha poblado adicionalmente con células.

5.1 BIOTEJIDO DE COLÁGENO

En el presente documento se desvela una membrana amniótica de colágeno, denominada en el presente documento biotejido de colágeno. El biotejido de colágeno mantiene la integridad estructural de la membrana amniótica nativa, sin tratar, es decir, mantiene la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas estructurales en sus composiciones tales como colágeno, elastina, y posiblemente fibronectina. Por lo tanto, el biotejido de colágeno que se desvela en el presente documento está formado por las mismas proteínas estructurales que las membranas amnióticas nativas o sin tratar. Los métodos de la técnica anterior para producir membranas amnióticas requieren el uso de proteasas o tratamiento con temperatura elevada, y como resultado estas membranas no mantienen la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas estructurales en su composición.

En una realización específica, la presente invención comprende una membrana amniótica deshidratada, descelularizada, y libre de sustrato (es decir, sin respaldo de filtro) de modo que la membrana amniótica tiene una estructura terciaria y cuaternaria nativa (Véase la FIGURA 2A y B). La membrana amniótica deshidratada y descelularizada comprendida en la invención es un biotejido uniforme, es decir, material mínimo a no celular, translúcido, que tienen aspecto tal como se muestra en la FIGURA 3 que comprende una lámina helicoidal alfa de triple hélice hacia la izquierda de la matriz descelularizada (Véase, por ejemplo, *Molecular Biology of the Cell*, 1989, Alberts *et al.*, ed., Garland Publishing Inc., Nueva York, NY).

El biotejido de colágeno comprendido en la invención puede tener su origen en la membrana amniótica de cualquier mamífero, por ejemplo, fuentes de equino, bovino, porcino o catarino, pero lo más preferentemente tienen su origen en placenta humana. En una realización preferente, el biotejido de la invención tiene la estructura terciaria y cuaternaria nativa del material de colágeno en su composición.

El biotejido de colágeno comprendido en la invención, al contrario los que se describen en la técnica anterior, se manipula de forma mínima, es decir, el biotejido de colágeno comprendido en la invención se somete como máximo a un tratamiento o manipulación química o biológica, por ejemplo, descelularización en un detergente débil. Tal como

se usa en el presente documento, "manipulado de forma mínima" se refiere a una falta de tratamiento enzimático, por ejemplo, tratamiento con proteasas, tratamiento con calor elevado, tratamiento químico agresivo, exposición a detergentes o ácidos fuertes de la membrana amniótica comprendida en la invención en cualquier etapa durante la preparación del biotejido de colágeno. El tratamiento con proteasas de la membrana amniótica, como parte de una etapa de descelularización, compromete la integridad estructural del biotejido, por ejemplo, afecta a la estructura terciaria y/o cuaternaria del material de colágeno. La manipulación mínima de la membrana amniótica en la preparación del biotejido de la invención, por el contrario, da como resultado un producto con mayor resistencia mecánica y un producto translúcido con respecto a los de la técnica anterior.

El biotejido de colágeno descelularizado, libre de sustrato comprendido en la invención, está formado por colágeno (incluyendo, pero no limitado a, colágeno de tipo I, IV, y II), así como fibronectina y elastina. Esta combinación es responsable en parte del aumento de la resistencia mecánica del biotejido comprendido en la invención, tal como se prepara de acuerdo con los métodos que se describen en el presente documento. Como resultado del procesamiento y manipulación mínimos, el biotejido de colágeno comprendido en la invención mantiene la composición de la membrana nativa. El colágeno es el material estructural principal de los vertebrados y está presente en tejidos de función principalmente mecánica. La molécula de colágeno consiste en tres cadenas de polipéptidos denominadas cadenas alfa (cada una de aproximadamente 1000 aminoácidos de longitud) entrelazadas entre sí al igual que en un acuerdo de tres hebras formando una superhélice que gira a la izquierda regular. Se han identificado al menos 19 tipos de colágeno y todos ellos poseen la misma organización tridimensional (Véase, por ejemplo, Lee *et al.*, 2001, *International J. of Pharmaceutics*, 221: 1-22).

La membrana amniótica comprendida en la presente invención es superior en forma, biomecánica, y características estructurales a las informadas en la técnica anterior y conocidas por los inventores, en parte, en base al descubrimiento de un nuevo método de preparación de la membrana amniótica y una fuente controlada y abundante de placenta humana, tal como se describe en el presente documento (Véase la Sección 5.2).

En particular, biotejido de colágeno comprendido en la presente invención tiene una o más de las siguientes características en comparación con una o más de las membranas amnióticas de la técnica anterior: mayor resistencia a la tracción; capacidad de sutura superior; inmunogenicidad reducida que da como resultado una reducción de la respuesta de rechazo huésped-injerto; facilidad de almacenamiento y transporte sin la necesidad de congelación ni criopreservación; requisitos mínimos de preparación posterior para manipulación y activación, es decir, rehidratación, procedimientos antes de su uso; y la capacidad para su almacenamiento a temperatura ambiente durante períodos de tiempo prolongados a la vez que se mantiene la integridad estructural y funcional. La Tabla 1 resumen las ventajas del biotejido de la invención en comparación con las de la técnica anterior.

Como alternativa, en el presente documento se desvela un biotejido de colágeno que comprende una membrana coriónica deshidratada, descelularizada, y libre de sustrato, preferentemente una membrana coriónica humana. Se espera que un biotejido de colágeno que comprende una membrana coriónica tenga propiedades comparables a las del biotejido de colágeno de la invención que comprende una membrana amniótica. En el presente documento se desvelan todas las formas médicamente útiles del biotejido de colágeno que comprende una membrana coriónica que incluyen, pero no se limitan a laminados, armazones tridimensionales, y composiciones de hidrogel.

TABLA 1. BIOTEJIDOS DE LA INVENCION FRENTE A PREPARACIONES DE MEMBRANA AMNIOTICA TRADICIONAL

CARACTERÍSTICA	BIOTEJIDO DE COLÁGENO DE LA INVENCION	MEMBRANAS AMNIOTICAS TRADICIONALES
Ensayo Serológico	COMPLETO: identificación sistemática de anticuerpo (ATY); alanina identificación sistemática de amino transferasa (ALT); Anticuerpo de Núcleo de Hepatitis (ácido nucleico y ELISA); Antígeno de Superficie de la Hepatitis B (ácido nucleico y ELISA); Anticuerpo del Virus de la Hepatitis C (ácido nucleico y ELISA); VIH-1 y VIH-2; HTLV-1 y HTLV-2; Ensayo de sífilis (RPR); ensayo de anticuerpo de CMV; ensayo de Hepatitis C y VIH (ensayo de ácido nucleico)	INCOMPLETE: Sin ensayo de CMV

CARACTERÍSTICA	BIOTEJIDO DE COLÁGENO DE LA INVENCION	MEMBRANAS AMNÍOTICAS TRADICIONALES
Conservación	SECO: Deshidratado al vacío con calor bajo; sin necesidad de congelador ni refrigeración; almacenamiento en estantería	CONGELADAS: almacenado en medio de cultivo; requiere transporte con hielo seco y congelador/refrigeración
Preparación Quirúrgica	MINUTOS: Preparar en minutos; hidratar directamente en el sitio quirúrgico; por ejemplo en el ojo con gotas salinas; no se necesita descongelación, inmersiones, ni aclarados	PERÍODO DE TIEMPO: requiere tiempo de preparación/descongelación/inmersión prolongado; se debe retirar el soporte de filtro
Manipulación Quirúrgica	SIMPLE: se puede recortar aunque esté seco; y aplicar al sitio quirúrgico y a continuación hidratar en el sitio	PESADO: Se debe retirar del papel de filtro; tiende a "contraerse" durante la cirugía; difícil de manipular quirúrgicamente
Celularidad	DESCELULARIZADO: células mínimas a no epiteliales; restos mínimas a no celulares; remodelación más rápida	CON CÉLULAS MUERTAS: células muertas presentes; la evidencia clínica sugiere tiempo de curado mayor/tasa de rechazo más elevada (evidencia anecdótica)
Sustrato	NO: Libre de sustrato (por ejemplo, sin soporte de filtro)	SÍ: soportado en nitrocelulosa/papel de filtro
Esterilización (Opcional)	SÍ: radiación con haz de electrones; al menos 18 kGy; aumento de la garantía de seguridad del tejido	NO: almacenado en medios que contienen antibióticos y glicerol (tóxico); sin esterilización terminal adecuada
Claridad del Tejido	TRANSLÚCIDO: Ópticamente transparente	OPACA: aspecto lechoso o turbio

5 En una realización precedente, el biotejido de colágeno comprendido en la invención es translúcido, es decir, ópticamente transparente. En otra realización preferente, el biotejido de colágeno comprendido en la invención es fino y de peso ligero. En una realización específica, el biotejido de colágeno deshidratado comprendido en la invención es de 0,3-0,6 mg/cm². En una realización específica, el biotejido de colágeno comprendido en la invención tiene un espesor de al menos 30 micrómetros. En otro ejemplo específico, el biotejido de colágeno comprendido en la invención tiene un espesor de aproximadamente 10-40 micrómetros.

10 En el presente documento se desvela el uso del biotejido de colágeno comprendido en la invención en diversas configuraciones, por ejemplo, insertos, protecciones. En general, el biotejido se puede configurar en cualquier forma médicamente útil. Por ejemplo, el biotejido de colágeno se puede configurar para uso en su totalidad, es decir, uso del biotejido de colágeno a partir de una placenta entera. Como alternativa, el biotejido de colágeno se puede cortar en tiras, parches o círculos, o se puede tejer en hilos. En otra realización, el biotejido de colágeno, en forma de una lámina o laminado de un solo con espesor, se puede recortar a intervalos regulares y expandir para formar, por ejemplo, una malla.

15 En algunas realizaciones, el biotejido de colágeno plano, por ejemplo, tiene una superficie sin pendiente ni curvatura. En otras realizaciones, el biotejido de colágeno comprendido en la invención no es completamente plano y tiene una superficie ondulada, por ejemplo, depresión o indentación en la superficie.

20 La invención incluye un laminado que comprende al menos dos capas del biotejido de colágeno de la invención. Las capas se pueden unir físicamente entre sí, por ejemplo a través del uso de un pegamento, un endurecedor, o sellando con calor una parte de los biotejidos, por ejemplo, la periferia de al menos una de dichas capas, para fusionar las capas. Dado que el biotejido tiene un "grano", el biotejido se puede laminar en una diversidad de formas. En una realización, todas las capas de dicho laminado tienen la misma orientación del grano. En otra realización, al menos una de las capas está en una orientación del grano que está girada aproximadamente 90 grados (es decir, es

aproximadamente perpendicular a) a la orientación del grano de al menos una de las otras capas. En una realización más específica, dichas capas perpendiculares son adyacentes entre sí. En otra realización más, dicho laminado comprende al menos tres capas del biotejido de colágeno, en el que las estructuras del grano de cada una de dichas al menos tres capas están giradas aproximadamente 60 grados con respecto a la estructura del grano de las dos capas restantes. En otra realización, dicho laminado contiene al menos un primer material y un segundo material, en el que dicho primer material es el biotejido de colágeno comprendido en la invención, y dicho segundo material es cualquier otra sustancia que puede formar un laminado con el biotejido de colágeno. En una realización específica, dicho segundo es una lámina o membrana derivada de una membrana distinta a la membrana amniótica. En otra realización específica, dicho segundo material no es un material natural, por ejemplo, polilactona, poliacetato, película de plástico, o similares. En algunas realizaciones, el laminado de membrana amniótica es una multicapa, que comprende al menos 6, al menos 8, al menos 10, al menos 20, al menos 80, al menos 100, al menos 1000 membranas amnióticas que se han preparado de acuerdo con los métodos de la invención. El laminado de membrana amniótica de la invención puede contener un número de capas ilimitado.

Los laminados tienen una rigidez estructural mayor que permite dar forma al laminado en estructuras tridimensionales complejas. Tales estructuras tridimensionales pueden incluir láminas, tubos, microsferas.

El biotejido de colágeno también se puede asociar con otro material, en una sola lámina o en forma de un laminado. Por ejemplo, el biotejido se puede asociar con, es decir, unir a, película de plástico flexible, gasa, láminas de plástico, endoprótesis vasculares, válvulas, dispositivos ortopédicos, vendajes, parches, etc.

El biotejido de colágeno puede comprender uno o más compuestos o sustancias que no forman parte de la matriz de colágeno del biotejido. Por ejemplo, el biotejido de colágeno se puede impregnar, durante la producción o durante la preparación para la cirugía, con una biomolécula. Tales biomoléculas incluyen, pero no se limitan, antibióticos (tales como Clindamicina, Minociclina, Doxiciclina, Gentamicina), hormonas, factores de crecimiento, agentes antitumorales, agentes antifúngicos, agentes antivirales, medicamentos para el dolor, antihistamínicos, agentes antiinflamatorios, agentes antiinfecciosos que incluyen, pero no se limitan a plata (tal como sales de plata, que incluyen, pero no se limitan a nitrato de plata y sulfadiazina de plata), plata elemental, antibióticos, enzimas bactericidas (tales como lisozoma), agentes para curación de heridas (tales como citoquinas que incluyen, pero no se limitan a PDGF, TGF; timosina), Ácido hialurónico como un agente para curación de heridas, selladores de heridas (tales como fibrina con o sin trombina), atractores celulares y reactivos para formación de armazones (tales como fibronectina) y similares. En un ejemplo específico, el biotejido de colágeno se puede impregnar con al menos un factor de crecimiento, por ejemplo, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento del epitelio, etc. El biotejido también se puede impregnar con moléculas orgánicas pequeñas tales como inhibidores específicos de procesos bioquímicos en particular, por ejemplo, inhibidores de receptores de membrana, inhibidores de quinasas, inhibidores del crecimiento, fármacos anticáncer, antibióticos, etc.

Además en otras realizaciones, el biotejido de colágeno comprendido en la invención se puede combinar con hidrogel. Cualquier composición de hidrogel conocida por un experto en la materia está incluida dentro de la invención, por ejemplo, cualquiera de las composiciones de hidrogel que se desvelan en las siguientes revisiones: Graham, 1998, *Med. Device Technol.* 9 (1): 18-22; Peppas *et al.*, 2000, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50 (1): 27-46; Nguyen *et al.*, 2002, *Biomaterials*, 23 (22): 4307-14; Henin *et al.*, 2002, *Adv. Drug Deliv. Rev* 54 (1): 13-36; Skelthorne *et al.*, 2002, *Med. Device Technol.* 13 (9): 19-23; Schmedlen *et al.*, 2002, *Biomaterials* 23: 4325-32. En una realización específica, la composición de hidrogel se aplica en el biotejido de colágeno, es decir, se descarga en la superficie del biotejido de colágeno. La composición de hidrogel, por ejemplo, se puede pulverizar en el biotejido de colágeno, suturar en la superficie del biotejido, empapar con el biotejido de colágeno, bañar con el biotejido de colágeno o revestir sobre la superficie del biotejido de colágeno.

Los hidrogeles útiles en los métodos y composiciones de la invención se pueden preparar a partir de cualquier polímero interactivo con el agua o soluble en agua conocido en la técnica, que incluye, pero no se limita a, alcohol de polivinilo (PVA), metacrilato de polihidroxietilo, polietilenglicol, polivinil pirrolidona, ácido hialurónico, dextrano o derivados y análogos de los mismos.

En algunas realizaciones, el biotejido de colágeno comprendido en la invención está impregnado adicionalmente con una o más biomoléculas antes de su combinación con un hidrogel. En otras realizaciones, la composición de hidrogel está impregnada adicionalmente con una o más biomoléculas antes de su combinación con un biotejido de colágeno comprendido en la invención. Tales biomoléculas incluyen, pero no se limitan a, antibióticos (tales como Clindamicina, Minociclina, Doxiciclina, Gentamicina), hormonas, factores de crecimiento, agentes antitumorales, agentes antifúngicos, agentes antivirales, medicamentos para el dolor, antihistamínicos, agentes antiinflamatorios, agentes antiinfecciosos que incluyen, pero no se limitan a plata (tal como sales de plata, que incluyen, pero no se limitan a nitrato de plata y sulfadiazina de plata), plata elemental, antibióticos, enzimas bactericidas (tales como lisozoma), agentes para curación de heridas (tales como citoquinas que incluyen, pero no se limitan a PDGF, TGF; timosina), Ácido hialurónico como un agente para curación de heridas, selladores de heridas (tales como fibrina con o sin trombina), atractores celulares y reactivos para formación de armazones (tales como fibronectina) y similares. En un ejemplo específico, el biotejido de colágeno o composición de hidrogel se puede impregnar con al menos un factor de crecimiento, por ejemplo, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento del epitelio, etc. Preferentemente, la biomolécula es un agente terapéutico.

En algunas realizaciones, la composición de hidrogel se combina con un laminado que comprende el biotejido comprendido en la invención.

5 La composición de biotejido de hidrogel/colágeno tiene uso en el campo médico incluyendo, pero no limitada a, el tratamiento de heridas, quemaduras, y afecciones de la piel (por ejemplo, para tratar la formación de cicatrices), usos cosméticos (por ejemplo, cirugía cosmética), y cualquier uso en forma de un implante. En algunas realizaciones, la composición biotejido de hidrogel/colágeno se aplica por vía tópica a un sujeto, es decir, en la superficie de la piel, por ejemplo, para el tratamiento de una herida. En otras realizaciones, la composición de biotejido de hidrogel/colágeno se puede usar en el interior de un sujeto, por ejemplo en forma de un implante, para que llegue a ser una estructura permanente o semipermanente en el organismo. En algunas realizaciones, las composiciones de hidrogel se formulan para que no sean biodegradables. Además, en otras realizaciones, la composición de hidrogel se formula para que sea biodegradable. En una realización específica, la composición de hidrogel se formula para que se degrade en días. En otra realización específica, la composición de hidrogel se degrada en meses.

15 En algunas realizaciones, el biotejido de colágeno comprendido en la invención se puebla con células, de modo que las células sean uniformes y confluentes. Las células que se pueden usar para poblar un biotejido comprendido en la invención incluyen, pero no se limitan a, células madre, preferentemente células madre humanas, células adultas diferenciadas humanas, células madre totipotentes, células madre pluripotentes, células madre multipotentes, células madre específicas de tejidos, células madre de tipo embrionario, células precursoras comprometidas, células de fibroblastoides. En el presente documento se desvela la población del biotejido de la invención con clases específicas de células precursoras que incluyen, pero no se limitan a, condrocitos, hepatocitos, células hematopoyéticas, células del parénquima pancreático, neuroblastos, y células precursoras de músculo. Las células no tienen su origen en embrión humano.

5.2 PROCESO PARA PRODUCIR BIOTEJIDOS DE COLÁGENO

25 En el presente documento se desvela un método para preparar un biotejido de colágeno comprendido en la invención. En particular, en el presente documento se desvela un método para preparar un biotejido de colágeno que comprende: proporcionar una placenta, que comprende una membrana amniótica y una membrana coriónica; separar la membrana amniótica de la membrana coriónica; y descellularizar la membrana amniótica. El método implica adicionalmente el lavado y el secado de la membrana amniótica descellularizada.

30 Preferentemente, la placenta es de una placenta humana para uso en sujetos humanos, o placenta de especies animales para uso en sujetos humanos, o placenta de especies animales para uso veterinario en sujetos animales.

35 Tal como se desvela en el presente documento, la placenta para uso en los métodos de la invención se toma tan pronto como sea posible después del nacimiento del recién nacido. Además, en otra realización preferente, la placenta se toma inmediatamente después del parto con sección de cesárea de un recién nacido sano normal, con la condición de que la placenta se recoja en condiciones asépticas. En algunas realizaciones, la placenta se almacena durante 48 horas desde el momento del parto antes de cualquier tratamiento adicional. En otras realizaciones, la placenta se almacena durante un máximo de 5 días desde el momento del parto antes de cualquier tratamiento adicional.

40 Preferentemente, la placenta, cordón umbilical, y sangre del cordón umbilical se transportan desde el parto o sala de partos a otra ubicación, por ejemplo, un laboratorio para su procesamiento adicional. La placenta se transporta preferentemente en un dispositivo estéril para transporte tal como una bolsa o un recipiente estéril, que opcionalmente se aísla térmicamente. En algunas realizaciones, la placenta se almacena a temperatura ambiente hasta el tratamiento adicional. En otras realizaciones, la placenta se refrigera hasta el tratamiento adicional, es decir, se almacena a una temperatura de aproximadamente 2° a 8 °C. Además como en otras realizaciones, la placenta se almacena en condiciones estériles durante un máximo de 5 días antes del tratamiento adicional. En una realización más preferente, la placenta se manipula y se procesa en condiciones asépticas, tal como lo conoce un experto en la materia. El laboratorio está equipado preferentemente equipado con un sistema de filtración con HEPA (tal como se define mediante la clasificación de habitación limpia, que tiene una clase de 1000 o superior). En una realización preferente, el sistema de filtración con HEPA se enciende al menos 1 hora antes del uso de la habitación de laboratorio para llevar a cabo los métodos de la invención.

50 En ciertas realizaciones, la placenta desangra, es decir, se drena completamente del cordón umbilical que permanece después del nacimiento. En algunas realizaciones, la placenta se desangra en un 70 %, se desangra en un 80 %, se desangra en un 90 %, se desangra en un 95 %, se desangra en un 99 %.

55 En el presente documento se desvela la identificación sistemática de la futura madre antes del momento del nacimiento, usando técnicas convencionales conocidas por un experto en la materia, para enfermedades de transmisión que incluyen, pero no se limitan a, VIH, VHB, VHC, HTLV, sífilis, CMV, y otros patógenos virales conocidos porque contaminan el tejido de la placenta. Preferentemente, los métodos usados para identificar sistemáticamente una enfermedad de transmisión siguen el reglamento tal como lo establece la Federal Drug Administration. La futura madre se puede identificar sistemáticamente (por ejemplo, se toma una muestra de sangre

con fines de diagnóstico) al mes del nacimiento, preferentemente a los dos meses del nacimiento, incluso más preferentemente a la semana del nacimiento, y lo más preferentemente, en el momento del nacimiento. Solamente se usan tejidos recogidos de donantes cuyas madres dieron negativo o no reactivo a los patógenos que se han mencionado anteriormente para producir un biotejido de la invención. Preferentemente, se obtiene una historia minuciosa paterna y médica y social detonante de la membrana de la placenta, que incluye por ejemplo, una historia familiar detallada.

El donante se identifica sistemáticamente usando ensayos serológicos y bacteriológicos convencionales usados por un experto en la materia. Cualquier ensayo o ensayo de diagnóstico que identifique el patógeno o patógenos está dentro del alcance del método de la invención, pero son ensayos preferentes los que combinan that combine una alta precisión con la capacidad de un rendimiento elevado. En el presente documento se desvela la identificación sistemática del donante usando técnicas convencionales conocidas por un experto en la materia para antígenos y/o anticuerpos. Un ejemplo no limitante de antígenos y anticuerpos incluye: identificación sistemática de anticuerpo (ATY); identificación sistemática de alanina amino transferasa (ALT); Anticuerpo de Núcleo de Hepatitis (ácido nucleico y ELISA); Antígeno de Superficie de Hepatitis B; Anticuerpo del Virus de la Hepatitis C; VIH-1 y VIH-2; HTLV-1 y HTLV-2; Ensayo de sífilis (RPR); ensayo de anticuerpo de CMV; y ensayo del Hepatitis C y VIH. Los ensayos usados pueden ser ensayos basados en ácidos nucleicos o ensayos basados en ELISA tal como lo conoce un experto en la materia.

En el presente documento se desvela adicionalmente el ensayo de la sangre del cordón umbilical del recién nacido usando técnicas convencionales conocidas por un experto en la materia (Véase, por ejemplo, Cotorruelo *et al.*, 2002, *Clin Lab.* 48 (5-6): 271-81; Maine *et al.*, 2001, *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 1 (1): 19-29; Nielsen *et al.*, 1987, *J. Clin. Microbiol.* 25 (8): 1406-10; todos los cuales se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad). En una realización, la sangre del cordón umbilical del recién nacido se somete a ensayo para patógenos bacterianos (incluyendo, pero no limitado a bacterias gram positivas y gram negativas) y hongos usando técnicas convencionales conocidas para un experto en la materia. En una realización específica, el grupo sanguíneo y el factor de Rh de la sangre del cordón umbilical del recién nacido se determina usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia. En otra realización, se obtiene CBC con diferenciar a partir del la sangre del cordón umbilical del recién nacido usando métodos convencionales conocidos por un experto en la materia. En otra realización más, se toma un cultivo de bacterias aeróbicas de la sangre del cordón umbilical del recién nacido, usando métodos convencionales conocidos por un experto en la técnica. Solamente se usan tejidos recogidos de donantes que tienen un CBC dentro de un límite normal (por ejemplo, ninguna anomalía ni desviación total del nivel normal), ensayo negativo para serología y bacteriología, y ensayo negativo o no reactivo para enfermedad infecciosa y contaminación para producir un biotejido de la invención.

Un método a modo de ejemplo para preparar un biotejido de colágeno comprendido en la invención comprende las siguientes etapas.

Etapas I. La invención incluye el procesamiento de la membrana de placenta de modo que el cordón umbilical se separa del disco placentario (opcionalmente), y separación de la membrana amniótica de la membrana coriónica. En una realización preferente, la membrana amniótica se separa de la membrana coriónica antes de cortar la membrana de la placenta. La separación de la membrana amniótica de la membrana coriónica se realiza preferentemente comenzando en el borde de la membrana de la placenta. En otra realización preferente, la membrana amniótica se separa de la membrana coriónica usando disección con punta roma, por ejemplo, con sin dedos enguantados. Después de la separación de la membrana amniótica de la membrana coriónica y del disco placentario, el tronco del cordón umbilical se corta por ejemplo, con tijeras, y se separa del disco placentario. En ciertas realizaciones, cuando no es posible la separación de las membranas amniótica y coriónica sin romper el tejido, la invención incluye el corte de las membranas amniótica y coriónica a partir del disco placentario como una pieza y a continuación separarlas aparte.

A continuación, la membrana amniótica se almacena preferentemente en una solución salina estéril. En algunas realizaciones, la solución salina estéril está tamponada. En una realización específica preferente, la solución salina estéril para almacenar la membrana amniótica es una solución de NaCl al 0,9 % estéril. Preferentemente, la membrana amniótica se almacena por refrigeración, a una temperatura de al menos 4 °C. En ciertas realizaciones, la membrana amniótica se refrigera a una temperatura de al menos 2 °C, al menos 6 °C, o hasta 8 °C. En este punto, la membrana amniótica se puede almacenar hasta 5 días, con la condición de que se refrigere y que se conserve cubiertas con solución salina estéril. Preferentemente, la membrana amniótica separada se refrigera durante un máximo de 72 horas desde el momento del parto antes de la siguiente etapa del proceso.

Etapas II. Una vez que la membrana amniótica se separa de la membrana coriónica, la invención incluye la descelerización de la membrana amniótica. Cualquier proceso de descelerización conocido por un experto en la materia está incluido en los métodos de la invención, con la condición de que el proceso para descelerizar la membrana amniótica de la invención no incluya ninguna congelación de la membrana amniótica. Tal como se usa en el presente documento, descelerizar se refiere a retirar cualquier material celular y residuo celular (por ejemplo, todo el material celular y residuo celular visibles) de las membranas amnióticas de la invención. La descelerización de la membrana amniótica asegura que se retiran básicamente todas las células asociadas normalmente con la matriz de colágeno de la membrana amniótica. La descelerización de la membrana amniótica de la invención que

retira "básicamente todas" las células asociadas con la matriz de colágeno retira preferentemente al menos un 90 % de las células, más preferentemente retira al menos un 95 % de las células, y lo más preferentemente, retira al menos un 99 % de las células. Las membranas amnióticas descelularizadas de acuerdo con los métodos de la invención son delgadas de forma uniforme, es decir, 10-40 micrómetros de espesor, lisas (tal como se determina con el tacto) y de aspecto transparente.

En una realización preferente, la descelularización de la membrana amniótica de la invención comprende retirar básicamente todo el material celular material y residuos celulares del lado materno de la membrana amniótica seguido de retirada de todo el material celular y residuos celulares del lado fetal de la membrana amniótica. En una realización específica, la descelularización de la membrana amniótica de la invención comprende raspado físico en combinación con aclarado con una solución estéril. En otra realización específica, el raspado físico de la membrana amniótica comprende raspado con un raspador de células estéril. Además, en otra realización específica, la solución estéril para aclarar la membrana amniótica durante la descelularización es una solución acuosa, una solución que comprende un tampón fisiológico o una solución salina tal como por ejemplo una solución de NaCl al 0,9 %.

La descelularización de la membrana amniótica comprende la retirada de células nativas y otros antígenos y residuos celulares de la membrana amniótica, y, opcionalmente, el tratamiento para inhibir la generación de nuevos sitios inmunológicos. Al descelularizar la membrana amniótica, se retiran células viables nativas así como otras estructuras o componentes celulares y acelulares que pueden provocar una respuesta inmune adversa. La técnica de descelularización usada de acuerdo con la invención no debería dar como resultado una alteración total de la anatomía de la membrana amniótica ni alterar las propiedades biomecánicas de su composición estructural, es decir, la integridad estructural y bioquímica del colágeno, elastina, y posiblemente fibronectina no se ven afectadas por la descelularización. De forma específica, el tratamiento químico agresivo y tratamiento con proteasas de la membrana amniótica no están dentro del alcance de la técnica de descelularización de la presente invención.

Preferentemente, la descelularización de la membrana amniótica comprende el uso de una solución que contiene detergente. Los detergentes que se pueden usar de acuerdo con los métodos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, detergentes no iónicos, Triton X-100, detergentes aniónicos, dodecil sulfato sódico. En los métodos de la presente invención, los detergentes se pueden usar solos o en combinación. Cualquier detergente aniónico suave, es decir, un detergente no cáustico, con un pH de 6 a 8, y baja formación de espuma, se puede usar de acuerdo con los métodos de la invención. En una realización específica, se usa monohidrato de la sal sódica del ácido desoxicólico al 0,01-1 % en la descelularización de la membrana amniótica. Aunque no se pretende quedar ligado a ningún modo de acción en particular, la descelularización de la membrana amniótica de acuerdo con los métodos de la invención puede alterar las membranas celulares y ayudar en la retirada de los residuos celulares de la membrana amniótica. Sin embargo, se deberían realizar etapas para eliminar cualquier nivel de detergente residual en la membrana amniótica, con el fin de, por ejemplo, evitar interferencias con la repoblación posterior de la membrana amniótica con células viables.

Es fundamental limitar la actividad de proteasa en la preparación del biotejido de la invención. Aditivos tales como agentes quelantes de iones metálicos, por ejemplo 1,10-fenantrolinea y ácido etilendiamintetraacético (EDTA), crean un entorno desfavorable para muchas enzimas proteolíticas. La provisión de condiciones subóptimas para proteasas tales como colagenasa, puede ayudar a la protección de las composiciones de membrana amniótica tales como colágeno de la degradación durante la etapa de lisis. Se pueden conseguir condiciones subóptimas para las proteasas mediante la formulación de la solución de lisis hipotónica para eliminar o limitar la cantidad de iones de calcio y cinc disponibles en la solución. Muchas proteasa son activas en presencia de iones de calcio y cinc y pierden una gran parte de su actividad en entornos libres de iones de calcio y cinc. Preferentemente, la solución de lisis hipotónica se preparará seleccionando condiciones de pH, reducción de la disponibilidad de iones de calcio y cinc, presencia de agentes quelantes de iones metálicos y el uso de inhibidores proteolítica específicos para colagenasas de modo que la solución lizará de forma óptima las células nativas a la vez que se protege la membrana amniótica subyacente de la degradación proteolítica adversa. Por ejemplo, una solución de lisis hipotónica puede incluir una solución tamponada de agua, pH 5,5 a 8, preferentemente pH 7 a 8, libre de iones de calcio y cinc y que incluye un agente quelante de ión metálico tal como EDTA. Además, también se pueden usar parámetros de control de temperatura y tiempo durante el tratamiento de la membrana amniótica con la solución de lisis hipotónica para limitar la actividad de las proteasas.

Es preferente que el tratamiento de descelularización de la membrana amniótica también limite la generación de nuevos sitios inmunológicos. Dado que se cree que la degradación enzimática del colágeno conduce a un aumento de la inmunogenicidad, la invención incluye el tratamiento de la membrana amniótica con enzimas, por ejemplo, nucleasas, que son eficaces para inhibir el metabolismo celular, producción de proteínas y división celular, que minimizan la proteólisis de las composiciones de la membrana amniótica conservando de este modo la arquitectura subyacente de una membrana amniótica. Ejemplos de nucleasas que se pueden usar de acuerdo con los métodos de la invención son las eficaces en la digestión del ADN y el ARN celular nativo incluyendo tanto exonucleasas como endonucleasas. Un ejemplo no limitante de nucleasas que se pueden usar de acuerdo con los métodos de la invención incluyen exonucleasas que inhiben la actividad celular, por ejemplo, ADNasa I (SIGMA Chemical Company, St. Louis, Mo.) y ARNasa A (SIGMA Chemical Company, St. Louis, Mo.) y endonucleasas que inhiben la actividad celular, por ejemplo, EcoR I (SIGMA Chemical Company, St. Louis, Mo.) y Hind I11 (SIGMA Chemical Company, St. Louis, Mo.). Es preferente que las nucleasas seleccionadas se apliquen en una solución de tampón

fisiológico que contiene iones, por ejemplo, magnesio, calcio, que son óptimas para la actividad de la nucleasa. Preferentemente, la concentración iónica de la solución tamponada, la temperatura de tratamiento y la duración del tratamiento lo selecciona un experto en la materia mediante experimentación de rutina para asegurar el nivel deseado de actividad de nucleasa. El tampón es preferentemente hipotónico para estimular el acceso de las nucleasas a interiores celulares.

En una realización específica, la descelularización de la membrana amniótica de la invención comprende las siguientes etapas. En primer lugar, la membrana amniótica se transfiere a un recipiente estéril limpio, y opcionalmente se aclara con agua estéril y se seca con gasa estéril. A continuación, el amnios se coloca en una bandeja estéril con el lado materno colocado hacia arriba. Usando un raspador de células estéril (por ejemplo, 32 cm, cuchilla PE, mango PS, NalgeNunc International), el amnios se descelulariza parcialmente por retirada físicamente de todo el material celular visible desde el lado materno de la membrana amniótica. Se usa agua estéril para ayudar en la retirada de las células y de los residuos celulares, si fuera necesario. Después de finalizar la descelularización parcial en el lado materno de la membrana amniótica, se da la vuelta a la membrana amniótica de modo que las caras del lado fetal están hacia arriba. Todos los restos celulares visibles en el lado fetal se retiran suavemente con un raspado de células usando una presión mínima en la membrana amniótica para evitar el desgarro. Se puede usar agua estéril para ayudar en la retirada de las células y de los residuos.

En una realización, la membrana amniótica descelularizada se coloca en un envase estéril relleno con una solución fisiológica estéril, por ejemplo, solución de NaCl al 0,9 % estéril, antes de su procesamiento adicional. De acuerdo con los métodos de la invención, la siguiente etapa de procesamiento de la membrana amniótica debería comenzar no más allá de 2-3 horas después de que se haya colocado la membrana amniótica en la solución fisiológica estéril. En una realización específica, en la que la Etapa III sigue inmediatamente a la Etapa II, no es necesario colocar la membrana amniótica en un recipiente con solución estéril.

La membrana amniótica se puede cortar durante el proceso de limpieza, usando por ejemplo un bisturí estéril, para darle forma para una limpieza más fácil o para retirar las zonas que no se pueden limpiar.

Etapa III. Después de la descelularización, la membrana amniótica se lava para asegurar la retirada de residuos celulares que pueden incluir proteínas celulares, lípidos celulares, y ácidos nucleicos celulares, así como cualquier residuo extracelular tal como proteínas solubles extracelulares, lípidos y proteoglicanos. Aunque no se pretende quedar ligado por ningún mecanismo de acción, la retirada de este residuo celular y extracelular reduce la inmunogenicidad de la membrana amniótica.

Una vez que las membranas amnióticas de la invención se descelularizan, las membranas se lavan adicionalmente con el fin de conseguir de forma eficaz la retirada completa de todo el material celular visible y residuos celulares de ambos lados de la membrana amniótica. La solución es preferentemente una solución hipotónica acuosa o de baja fuerza iónica formulada para lisar de forma eficaz las células de tejido nativo. Tal solución hipotónica acuosa puede ser agua desionizada o un tampón hipotónico acuoso. Preferentemente, el tampón hipotónico acuoso contiene adicionalmente aditivos que proporcionan condiciones subóptimas para la actividad de las proteasas, por ejemplo colagenasa, que se pueden liberar como resultado de la lisis celular.

Preferentemente, la membrana amniótica se agita suavemente en el detergente, por ejemplo, en una plataforma oscilante, para ayudar en la descelularización. En ciertas realizaciones, la membrana amniótica se agita durante al menos 15 minutos, al menos 20 minutos, al menos 30 minutos, o hasta 120 minutos. La membrana amniótica, después de descelularización con detergente, se puede descelularizar físicamente de nuevo tal como se ha descrito anteriormente; las etapas de descelularización física y con detergente se pueden repetir cuando sea necesario, siempre y cuando se mantenga la integridad de la membrana amniótica, hasta que no quede material celular ni residuos celulares visibles.

En una realización específica, el lavado de la membrana amniótica comprende las siguientes etapas: la membrana amniótica descelularizada se coloca en un envase estéril que a continuación se rellena con una solución de descelularización en una cantera suficiente para cubrir la membrana amniótica; el envase con la membrana amniótica y la solución de descelularización a continuación se colocan en una plataforma oscilante (por ejemplo, Modelo 100, VWR Scientific Products Corp., P.O. Box 640169, Pittsburgh, PA 15264-0169). La membrana amniótica en la solución de descelularización a continuación se agita entre 15 minutos y 120 minutos en la plataforma oscilante. Después de la etapa de agitación, la membrana amniótica se retira del recipiente y se coloca en una bandeja estéril limpia rellena con una solución estéril, por ejemplo, solución de NaCl al 0,9 %. Usando un nuevo Raspador de Células estéril, se retira la solución de descelularización residual y se retira cualquier material celular restante de ambos lados de la membrana amniótica. Esta etapa se puede repetir tantas veces como sea necesario para retirar todo el material celular residual visible de ambos lados de la membrana amniótica.

En ciertas realizaciones, la membrana amniótica se seca inmediatamente (es decir, en 30 minutos) después de la etapa de descelularización. Como alternativa, cuando el procesamiento adicional no se realiza inmediatamente, la membrana amniótica se puede refrigerar, por ejemplo, almacenar a una temperatura de 2-8 °C, durante un máximo de 28 días antes del secado. Cuando la membrana amniótica descelularizada se almacena durante más de tres días pero menos de 28 días, la solución estéril que cubre la membrana amniótica se cambia preferentemente de forma

periódica, por ejemplo, cada 1-3 días.

En ciertas realizaciones, cuando la membrana amniótica no se refrigera después del lavado, la membrana amniótica se lava al menos 3 veces antes de avanzar a la Etapa IV de la preparación. En otras realizaciones, cuando la membrana amniótica se ha refrigerado y la solución estéril se ha cambiado una vez, la membrana amniótica se lava al menos dos veces antes de avanzar a la Etapa IV de la preparación. Además, en otras realizaciones, cuando la membrana amniótica sea refrigera en soluciones estéril se ha cambiado dos veces o más, la membrana amniótica se lava al menos una vez antes de avanzar a la Etapa IV de la preparación.

Entre aplicaciones específicas, la membrana amniótica descelularizada se almacena en condiciones estériles, y no se realiza procesamiento adicional, es decir, no se seca. Antes de avanzar a la Etapa IV, es fundamental que se evalúen todos los ensayos bacteriológicos y serológicos para asegurar que todos los ensayos eran negativos.

Etapa IV. La etapa final del método de la invención comprende el secado de la membrana amniótica descelularizada de la invención para producir el biotejido de colágeno. Se puede usar cualquier método de secado de la membrana amniótica con el fin de producir una lámina de colágeno plana, seca. Preferentemente, sin embargo, la membrana amniótica se seca al vacío.

En una realización específica, un método a modo de ejemplo para secar la membrana amniótica descelularizada de la invención comprende las siguientes etapas:

Ensamblaje de la membrana amniótica descelularizada para su secado. La membrana amniótica descelularizada se retira de la solución estéril, y el exceso de fluido se aprieta suavemente. La membrana amniótica descelularizada se estira suavemente a continuación hasta que está plana con el lado fetal con la cara en una posición hacia abajo, por ejemplo, en una bandeja. A continuación, se da la vuelta a la membrana amniótica descelularizada de modo que el lado fetal tiene la cara hacia arriba, y se coloca en un marco de secado, preferentemente marco de secado de malla de plástico (por ejemplo, Quick Count[®] Plastic Canvas, Uniek, Inc., Waunakee, WI). En otras realizaciones, el marco de secado puede ser una malla de acero inoxidable que se puede usar en autoclave. En una realización más preferente, aproximadamente 0,5 centímetros de la membrana amniótica se superponen a los bordes del marco de secado. En ciertas realizaciones, la superposición de la membrana amniótica que se extiende más allá del marco de secado se envuelve sobre la parte superior del marco, por ejemplo, usando un elemento de sujeción o un hemóstato. Una vez que la membrana amniótica coloca en el marco de secado, una gasa estéril se coloca en la plataforma de secado de un secador de calor (o secador de gel) (por ejemplo, Modelo 583, Bio-Rad Laboratories, 200 Alfred Nobel Drive, Hercules, CA 94547), de modo que se cubre un área ligeramente superior que la membrana amniótica que descansa en el marco de secado de malla de plástico. Preferentemente, el espesor total de la capa de gasa no supera el espesor de una pasa de 4 x 4 doblada. Se puede usar cualquier aparato de secado con calor que sea adecuado para el secado del material de tipo lámina. El marco de secado se coloca en la parte superior de la gasa en la plataforma de secado de modo que los bordes del marco de plástico se extienden por encima y más allá de los bordes de la gasa, preferentemente entre 0,1 - 1,0 cm, más preferentemente 0,5-1,0 cm. En una realización más preferente, el marco de secado que tiene la membrana amniótica se coloca en la parte superior de la gasa estéril con el lado fetal de la membrana amniótica con la cara hacia arriba. En algunas realizaciones, otra malla de marco de plástico se coloca en la parte superior de la membrana amniótica. En la FIGURA 4 se muestra una vista del marco de malla y de la membrana secada en el mismo. En otras realizaciones, una lámina de plástico fino (por ejemplo, SW 182, PVC transparente, AEP Industries Inc., South Hackensack, NJ 07606) o una silicona biocompatible se coloca en la parte superior de la malla cubierta con membrana de modo que la lámina se extiende más allá de todos los bordes. En esta realización, el segundo marco de malla no es necesario.

En una realización alternativa, se colocan en la membrana amniótica una o más láminas estériles de material Tyvek (por ejemplo, una lámina de Tyvek para envasado médico, Dupont Tyvek[®], P.O. Box 80705, Wilmington, DE 19880-0705), opcionalmente, con una lámina de Tyvek en la parte superior de la membrana (antes de colocar la lámina de plástico). Este proceso alternativo producirán una versión más lisa del biotejido (es decir, sin el patrón de regiones de compresión de fibra diferencial a lo largo y perpendicular al eje del material), que puede ser ventajosa para determinadas aplicaciones, tales como, por ejemplo, para uso como una matriz para la expansión de células, tal como se describe en el presente documento.

Secado de la membrana amniótica. En una realización preferente, la invención incluye el secado con calor de la membrana amniótica de la invención al vacío. Aunque el secado al vacío se puede conseguir a cualquier temperatura de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 60 °C, la membrana amniótica se seca preferentemente entre aproximadamente 35 °C y aproximadamente 50 °C, y lo más preferentemente a aproximadamente 50 °C. Se debería observar que se espera una cierta degradación del colágeno a temperaturas superiores a 50 °C. La temperatura de secado se ajusta preferentemente y se verifica usando un termómetro digital calibrado usando una sonda extendida. Preferentemente, la presión de vacío se ajusta a aproximadamente -559 mm de Hg. La etapa de secado continúa hasta que la matriz de colágeno de la membrana amniótica contiene menos de un 3-12 % de agua tal como se determina, por ejemplo, con un analizador de humedad. Para conseguir esto, la membrana amniótica se puede secar al vacío con calor, por ejemplo, durante aproximadamente 60 minutos para conseguir una membrana amniótica deshidratada. En algunas realizaciones, la membrana amniótica se seca de aproximadamente 30 minutos a 2 horas, preferentemente aproximadamente 60 minutos. Aunque no se pretende quedar ligado por ningún

mecanismo de acción, se cree que del ajuste de calor bajo acoplado con presión de vacío permite que la membrana amniótica consiga el estado deshidratado sin desnaturalizar el colágeno.

Después de la finalización del proceso de secado de acuerdo con la invención, la membrana amniótica se enfría durante aproximadamente dos minutos con la bomba de vacío funcionando.

5 *Envasado y Almacenamiento de la Membrana Amniótica.* Una vez que la membrana amniótica se seca de acuerdo con los métodos de la invención tal como se ha descrito, la membrana se despegua suavemente del marco de secado. El "despegado" de la membrana puede comprender las siguientes etapas: aunque la bomba todavía esté funcionando, la película de plástico se retira suavemente de la membrana amniótica comenzando en la esquina, a la vez que se mantiene la membrana amniótica debajo; el marco con la membrana amniótica se despegua de la plataforma de secado y se coloca en una tabla para cortar con la cara de la membrana amniótica mirando hacia arriba; se hace una incisión, cortando a lo largo del borde 1-2 mm más allá del borde del marco; a continuación la membrana amniótica se retira del marco; y se corta en tamaños apropiados tal como lo determine su uso posterior. Preferentemente, la manipulación de de la membrana amniótica en esta etapa se realiza con guantes estériles.

15 La membrana amniótica se coloca en un recipiente estéril, por ejemplo, bolsa para pelar, y se cierra herméticamente. El biotejido producido de acuerdo con los métodos de la invención se puede almacenar a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo prolongado tal como se ha descrito anteriormente.

20 En el presente también documento se desvela un método para preparar un biotejido de colágeno que comprende una membrana coriónica. Se espera que los métodos que se han descrito anteriormente se puedan aplicar en el método para preparar un biotejido que comprende una membrana coriónica. En el presente documento también se desvela un método para preparar un biotejido de colágeno que comprende: proporcionar una placenta, que comprende una membrana amniótica y una membrana coriónica; separar la membrana amniótica de la membrana coriónica; y descelularizar la membrana coriónica. El método incluye adicionalmente lavar y secar la e membrana coriónica descelularizada.

5.2.1 MÉTODOS PARA PREPARAR ARMAZONES Y LAMINADOS TRIDIMENSIONALES

25 La invención proporciona métodos para preparar armazones tridimensionales, configuraciones y laminados tridimensionales que comprenden el biotejido de colágeno comprendido en la invención.

30 En algunas realizaciones, la invención proporciona un método para preparar un laminado de membrana amniótica que comprende: proporcionar una placenta, preferentemente una placenta humana, que comprende una membrana amniótica y una membrana coriónica, separar la membrana amniótica de la membrana coriónica, usando métodos que se desvelan en el presente documento; descelularizar la membrana amniótica, usando métodos que se desvelan en el presente documento; lavar la membrana amniótica descelularizada al menos una vez usando métodos que se desvelan en el presente documento; formar capas de al menos dos de las membranas amnióticas descelularizadas en contacto entre sí de modo que se forma el laminado de membrana amniótica; y secar el laminado de membrana amniótica, usando métodos que se desvelan en el presente documento.

35 Como alternativa, en otra realización, el método para preparar un laminado de membrana amniótica comprende, secar al menos dos membranas amnióticas preparadas de acuerdo con los métodos de la invención, y formar capas de al menos dos membranas amnióticas en contacto entre sí de modo que se forme un laminado de membrana amniótica.

40 En algunas realizaciones, las capas de membrana amniótica producidas de acuerdo con los métodos de la invención se pueden colocar en contacto entre sí en presencia de un adhesivo para formar un laminado de membrana amniótica. El adhesivo usado de acuerdo con los métodos y composiciones de la invención puede ser cualquier pegamento biológico conocido por un experto en la materia, preferentemente un pegamento biocompatible, que incluye, pero no se limita a, pegamento natural, por ejemplo, fibronectina, fibrina, pegamento sintético. En otras realizaciones, las capas de membrana amniótica preparadas de acuerdo con los métodos de la invención se reticularan entre sí para formar un laminado de membrana amniótica. Cualquier reactivo y método de reticulación conocido por un experto en la materia está dentro del alcance de la presente invención, que incluyen, pero no se limitan a, reticulación química, reticulación peptídica, reticulación por UV, reticulación por radiación, reticulación con fibronectina, reticulación con fibrinógeno, reticulación con hidrogel. En otras realizaciones, los laminados de membrana amniótica producidos de acuerdo con los métodos de la invención no comprenden un adhesivo.

50 5.3 ALMACENAMIENTO Y MANIPULACIÓN DEL BIOTEJIDO DE COLÁGENO

55 En el presente documento se desvela el almacenamiento del biotejido de colágeno comprendido en la invención en forma de láminas deshidratadas a temperatura ambiente (por ejemplo, 25 °C). El biotejido de colágeno comprendido en la invención se puede almacenar a una temperatura de al menos 10 °C, al menos 15 °C, al menos 20 °C, al menos 25 °C, o al menos 29 °C. Preferentemente, el biotejido de colágeno comprendido en la invención no está refrigerado. Tal como se desvela en el presente documento, el biotejido de colágeno comprendido en la invención se puede refrigerar a una temperatura de aproximadamente 2 a 8 °C. Tal como se desvela en el presente documento, el biotejido de colágeno comprendido en la invención se puede almacenar a cualquiera de las temperaturas que se

han identificado anteriormente durante un período de tiempo prolongado. Tal como se desvela en el presente documento, el biotejido de colágeno comprendido en la invención se almacena en condiciones estériles y no oxidantes. El biotejido producido de acuerdo con los métodos de la invención se puede almacenar a cualquiera de las temperaturas especificadas durante 12 meses o más sin alteración de la integridad bioquímica o estructural (por ejemplo, sin degradación), sin ninguna alteración de las propiedades bioquímicas o biofísicas del biotejido de colágeno. El biotejido producido de acuerdo con los métodos de la invención se puede almacenar durante varios años sin alteración de la integridad bioquímica o estructural (por ejemplo, sin degradación), sin ninguna alteración de las propiedades bioquímicas o biofísicas del biotejido de colágeno. Se espera que el biotejido de la invención preparado de acuerdo con los métodos de la invención dure de forma indefinida. El biotejido se puede almacenar en cualquier recipiente adecuado para almacenamiento a largo plazo. Preferentemente, el biotejido de colágeno de la invención se almacena en un envase de bolsa para pelar doble estéril.

La invención incluye la manipulación del biotejido de colágeno en su estado seco. En una realización específica, el biotejido de colágeno se recorta antes de su uso, por ejemplo antes de su uso como un injerto quirúrgico. La invención incluye cualquier dimensión del biotejido de la invención que sea compatible para su uso, tal como lo determina un experto en la materia. En algunas realizaciones, la invención incluye un biotejido de colágeno que tiene 1 x 2 cm; 2 x 3 cm; 4 x 4 cm, 5 x 5 o 6 x 8. El biotejido de la invención se puede cortar en cualquier tamaño necesario que esté dentro de la limitación del tamaño de la membrana amniótica.

La orientación de la superficie del biotejido de colágeno de la invención se puede identificar de forma visual. El biotejido de colágeno de la invención tiene un diseño "reticular", que permite la identificación visual de las superficies materna y fetal por un experto en la materia. En una realización específica, la orientación de la superficie del biotejido de colágeno se identifica con aumento. Un experto en la materia observará que el lado fetal del biotejido de colágeno se puede identificar por su diseño reticular cóncavo, es decir, hueco. Al contrario, el lado materno se puede identificar por su diseño reticular convexo, es decir, elevado.

El biotejido de colágeno comprendido en la invención requiere un tiempo de preparación mínimo antes de su uso. En una realización preferente, el biotejido de colágeno comprendido en la invención está listo para usar en 5 minutos o menos, en 10 minutos o menos, en 15 minutos o menos. El tiempo de preparación del biotejido de colágeno comprendido en la invención antes de su uso, por ejemplo, como un injerto quirúrgico, comprende activación mediante rehidratación del biotejido de colágeno deshidratado. En algunos casos, el biotejido de colágeno comprendido en la invención está hidratado aunque está en el sitio quirúrgico. En otros casos, el biotejido de colágeno «comprendido en la invención se hidrata en condiciones estériles en una placa. En el presente documento se desvela la hidratación del biotejido de colágeno comprendido en la invención usando un tampón fisiológico estéril. En el presente documento se desvela la hidratación del biotejido de colágeno comprendido en la invención con una solución salina estéril, por ejemplo, solución de NaCl al 0,9 % estéril. En algunos casos, la solución salina estéril está tamponada. La hidratación del biotejido de colágeno comprendido en la invención requiere al menos 2 minutos, al menos 5 minutos, al menos 10 minutos, al menos 15 minutos, o al menos 20 minutos. Tal como se desvela en el presente documento, la hidratación del biotejido de colágeno comprendido en la invención se completa en 5 minutos. Además, en otro caso, la hidratación del biotejido de colágeno comprendido en la invención se completa en 10 minutos. Además, en otro caso, la hidratación del biotejido de colágeno comprendido en la invención no necesita más de 10 minutos.

El biotejido de colágeno comprendido en la invención, una vez hidratado para su uso, por ejemplo como un injerto quirúrgico, tiene un aumento de la capacidad de sutura con respecto a las membranas amnióticas de la técnica, tal como lo determina un experto en la materia. El Biotejido de colágeno comprendido en la invención no se rompe tan fácilmente ni es tan friable como las membranas amnióticas de la técnica. La invención incluye biotejidos de colágeno que se pueden suturar de forma eficaz.

5.3.1 ESTERILIZACIÓN

La esterilización del biotejido de la invención se realiza preferentemente por radiación con haz de electrones usando métodos conocidos por un experto en la técnica, por ejemplo, Gorham, D. Byrom (ed.), 1991, Biomaterials. Stockton Press, Nueva York, 55-122. Cualquier dosis de radiación suficiente para eliminar al menos un 99,9 % de las bacterias u otros organismos potencialmente contaminantes se desvela en el presente documento. Tal como se desvela en el presente documento, se usa una dosis de al menos 18-25 kGy para conseguir la esterilización final del biotejido de la invención. La esterilización del biotejido de la invención no incluye, sin embargo, el almacenamiento en antibióticos o glicerol.

5.4 MÉTODOS DE USO DEL BIOTEJIDO DE COLÁGENO DE LA INVENCION

El biotejido de colágeno comprendido en la invención tiene numerosos usos en el campo médico y quirúrgico debido, en parte, a sus propiedades físicas, tales como resistencia biomecánica, flexibilidad, capacidad de sutura, inmunogenicidad baja en comparación con las membranas tradicionales usadas en la técnica en. Por ejemplo, se espera que el biotejido de colágeno comprendido en la invención tenga una mayor utilidad terapéutica para regeneración guiada de tejidos con respecto a las membranas de la técnica anterior, por ejemplo, membranas sintéticas de PTFE que no se reabsorben tales como Goretex™; membranas sintéticas que se reabsorben formadas

a partir de copolímeros de glicólido y lactida; membranas que se desvelan en el documento de patente WO-88/08305; documentos de patentes DE-2631909, Patente de Estados Unidos N° 5.837.278.

5 El método para preparar el biotejido de colágeno comprendido en la invención asegura la conservación de la estructura terciaria y cuaternaria del biotejido haciendo de este modo que el biotejido sea ideal para su uso pretendido en el campo médico y quirúrgico. Tal como se describe con detalle a continuación, la invención proporciona biotejidos de colágeno cuyas propiedades físicas permiten que sea adecuado para usos en una diversidad de aplicaciones médicas y dentales que incluyen, pero no se limitan a reparación de vasos sanguíneos, reparación del útero, sustituciones de tendones, sustituciones de córnea, piel artificial, tratamiento de la enfermedad periodontal, y curación de heridas. Dependiendo de su uso pretendido, la invención incluye el uso del biotejido de colágeno como una membrana de dos dimensiones, por ejemplo, membranas que se pueden modelar para que formen vasos tubulares; como un armazón tridimensional, por ejemplo, un implante, o como una fibra de una dimensión.

5.4.1 MÉTODOS DE TRATAMIENTO USANDO EL BIOTEJIDO DE COLÁGENO DE LA INVENCION

5.4.1.1 MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DE AFECCIONES CUTÁNEAS

15 La piel humana es un material formado por la epidermis y la dermis. La parte superior de la epidermis es el estrato córneo; que es la capa más dura de la piel, así como la más afectada por el entorno que la rodea. Por debajo del estrato córneo se encuentra la parte interna de la epidermis. Por debajo de la epidermis está la dermis papilar, que está formada por tejidos conjuntivos relativamente flexibles que definen el microrrelieve de la piel. La dermis reticular, colocada por debajo de la dermis papilar, es un tejido apretado, conjuntivo que se organiza en el espacio. La dermis reticular también está asociada con arrugas gruesas. Por debajo de la dermis se encuentra la capa subcutánea.

20 Las principales funciones de la piel incluyen protección, excreción, secreción, absorción, termorregulación, pigmentogénesis, acumulación, percepción sensorial, y regulación de procesos inmunológicos. Estas funciones se ven afectadas de forma perjudicial por los cambios en la estructura de la piel debido al envejecimiento y a una exposición excesiva al sol. Los cambios fisiológicos asociados con el envejecimiento cutáneo incluyen alteración de la función de barrera y disminución de la renovación de células epidérmicas, por ejemplo, Véase, Cerimele, D. *et al.*, 1990, *Br. J. Dermatol*, 122 Supl. 35, p. 13-20. Los métodos y composiciones de la técnica anterior, sin embargo, han tenido un éxito limitado para mejorar las condiciones de la piel, por ejemplo, aumento de la elasticidad de la piel y suavidad, o eliminación de arrugas.

30 El biotejido de colágeno comprendido en la invención tiene aplicaciones médicas así como cosméticas. El biotejido de colágeno comprendido en la invención tiene utilidad clínica y terapéutica en el tratamiento de las afecciones cutáneas que incluyen, pero no se limitan a lesiones cutáneas, envejecimiento de la piel, arrugas, líneas finas, adelgazamiento, reducción de la elasticidad de la piel, piel áspera, afecciones cutáneas congénitas y degenerativas, deficiencia de colágeno VII, y piel dañada por el sol. En ciertas realizaciones, el biotejido de colágeno comprendido en la invención se puede usar en forma de un implante subcutáneo para afecciones cutáneas tales como cicatrices por acné, surcos glabellares, cicatrices por extirpación, o cualquier otro defecto del tejido blando en la técnica. El biotejido de colágeno comprendido en la invención tienen utilidad clínica y terapéutica en el tratamiento de cambios asociados con el envejecimiento cutáneo. En ciertas realizaciones, el biotejido de colágeno comprendido en la invención tiene utilidad en la mejora de las arrugas de la piel, y/o otras condiciones tales como elasticidad y suavidad de la piel. El biotejido de colágeno comprendido en la invención se puede usar como un implante, como un laminado, o como una forma enrollada tridimensional para el tratamiento de afecciones cutáneas. Se espera que el biotejido de colágeno comprendido en la invención tenga una mayor utilidad clínica con respecto a los métodos conocidos en la técnica para el tratamiento de dichas afecciones cutáneas, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N° 5.972.999; N° 5.418.875; N° 5.332.579, N° 5.198.465, en parte, debido a su estabilidad, puede proporcionar un efecto más duradero.

35 En una realización preferente, el biotejido de colágeno comprendido en la invención está complementado adicionalmente con uno o más agentes conocidos en la técnica para el tratamiento de una afección cutánea. Ejemplos de tales agentes, incluyen, pero no se limitan a, vitaminas, minerales, preparaciones basadas en catequinas, N-acetilglucosamina, y glucosamina (Véase, por ejemplo, Neldner, 1993, *Amer. Acad. Derm. Annl Mtg.* Wash. DC; Lubell 1996, *Cosmetic Dermatol*, 9 (7): 58-60; Swaine *et al.*, 1995, *J. Am. Board of Family Practice*, 8 (3): 206-16; Shan *et al.*, 1994, *Kidney International*, 46(2): 388-95.

40 El biotejido de colágeno comprendido en la invención se puede impregnar con cualquier biomolécula con utilidad en el tratamiento de una afección cutánea, que incluyen, pero no se limitan a, antibióticos (tales como Clindamicina, Minociclina, Doxiciclina, Gentamicina), hormonas, factores de crecimiento, agentes antitumorales, agentes antifúngicos, agentes antivirales, medicamentos para el dolor, antihistamínicos, agentes antiinflamatorios, agentes antiinfecciosos que incluyen, pero no se limitan a plata (tal como sales de plata, que incluyen, pero no se limitan a nitrato de plata y sulfadiazina de plata), plata elemental, antibióticos, enzimas bactericidas (tales como lisozoma), agentes para curación de heridas (tales como citoquinas que incluyen, pero no se limitan a PDGF, TGF; timosina), Ácido hialurónico como un agente para curación de heridas, selladores de heridas (tales como fibrina con o sin

trombina), atractores y reactivos celulares para formación de armazones (tal como fibronectina) y similares. En un ejemplo específico, el biotejido de colágeno se puede impregnar con al menos un factor de crecimiento, por ejemplo, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento epitelial, etc. El biotejido también se puede impregnar con moléculas pequeñas tales como moléculas orgánicas pequeñas tales como inhibidores específicos de procesos bioquímicos en particular, por ejemplo, inhibidores de receptores de membrana, inhibidores de quinasas, inhibidores del crecimiento, fármacos anticáncer, antibióticos, etc.

5.4.1.2 HERIDAS Y QUEMADURAS

Se espera que el biotejido de colágeno comprendido en la invención tenga un aumento de la utilidad clínica como un apósito para heridas, para aumentar la reparación del tejido duro y/o blando, en comparación con otros biomateriales conocidos en la técnica, por ejemplo, los que se describen en las Patentes de Estados Unidos N° 3.157.524; N° 4.320.201; N° 3.800.792; N° 4.837.285; N° 5.116.620, debido en parte a sus propiedades físicas. Dado que el biotejido de colágeno comprendido en la invención mantiene la estructura cuaternaria nativa del colágeno proporciona un aumento del crecimiento interior del tejido a través de la migración celular en los intersticios de la matriz de colágeno. El biotejido comprendido en la invención permite que las células se unan y crezcan en la matriz de colágeno, y que sinteticen sus propias macromoléculas. Por lo tanto, las células producen una nueva matriz que permite el crecimiento del nuevo tejido. Tal desarrollo celular no se observa en otras formas conocidas de colágeno tales como fibras, lanas y colágeno soluble.

En el presente documento se desvela el tratamiento de una herida colocando el biotejido de colágeno comprendido en la invención directamente en la piel del sujeto, es decir, en el estrato córneo, en el sitio de la herida, de modo que la herida queda cubierta, por ejemplo, usando una cinta adhesiva. En el presente documento se desvela el tratamiento de una herida usando el biotejido de colágeno comprendido en la invención en forma de un implante, por ejemplo, en forma de un implante subcutáneo.

En el presente documento se desvela la tasa de curación de heridas mediante la adición de una macromolécula capaz de estimular el crecimiento hacia el interior del tejido del biotejido de colágeno de la invención. Tales macromoléculas incluyen, pero no se limitan a, ácido hialurónico, fibronectina, laminina, y proteoglicanos (Véase, por ejemplo, Doillon *et al.* (1987) *Biomaterials* 8: 195-200; y Doillon y Silver (1986) *Biomaterials* 7: 3-8).

En el presente documento se desvela la incorporación de agentes farmacológicamente activos que incluyen, pero no se limitan a factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento de tipo insulínico, factor de crecimiento epidérmico, factor beta de crecimiento de transformación, factor de angiogénesis, antibióticos, agentes antifúngicos, agentes espermicida, hormonas, enzimas, inhibidores enzimáticos en el biotejido de colágeno de la invención tal como se describe en el presente documento en la sección 5.4.2.7 para su administración a la piel, y cualquier biomolécula que se ha descrito anteriormente. Preferentemente, los agentes farmacológicamente activos se proporcionan en una cantidad fisiológicamente eficaz.

En algunas realizaciones, el biotejido de colágeno se puebla adicionalmente con células vivas, que incluyen, pero no se limitan a células madre alogénicas, células madre, y células adultas autólogas, antes de su aplicación al sitio de la herida. Las células no tienen su origen en embrión humano.

El biotejido de colágeno comprendido en la invención es particularmente útil para el tratamiento de infecciones de heridas, por ejemplo, infecciones de heridas después de una degradación de heridas quirúrgicas o traumáticas. En una realización en particular, el biotejido de colágeno se impregna con una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente útil en el tratamiento de una infección de herida, que incluye, pero no se limita a, un antibiótico, un agente antimicrobiano, y un agente antibacteriano. El biotejido de colágeno comprendido en la invención tiene utilidad clínica y terapéutica en el tratamiento de infecciones de heridas por cualquier microorganismo conocido en la técnica, por ejemplo, microorganismos que infectan heridas que se originan dentro del cuerpo humano, que es un depósito conocido para los organismos patógenos, o de origen ambiental. Un ejemplo no limitante de los microorganismos, cuyo crecimiento en heridas se puede reducir o evitar con los métodos y composiciones de la invención son especies de *S. aureus*, *St. epidermis*, *Streptococos* beta hemolíticos, *E. coli*, *Klebsiella* y *Pseudomonas*, y entre las bacterias anaerobias, las *Clostridium welchii* o *tartium*, que son la causa de gangrena gaseosa, principalmente en heridas traumáticas profundas.

Tal como se desvela en el presente documento, el biotejido de colágeno comprendido en la invención se usa para el tratamiento de heridas, que incluyen, pero no se limitan a heridas epidérmicas, heridas cutáneas, heridas crónicas, heridas agudas, heridas externas, heridas internas (por ejemplo, el biotejido de colágeno se pueden volver alrededor de un sitio de anastomosis durante la cirugía para evitar la pérdida de sangre de las líneas de sutura, y para evitar que el organismo forme adherencias en el material de sutura), heridas congénitas (por ejemplo, epidermólisis bullosa distrofica). En particular, el biotejido de colágeno presenta un aumento de la utilidad en el tratamiento de úlceras de presión (por ejemplo, úlceras de decúbito). Las úlceras de presión se producen frecuentemente en pacientes sujetos a un reposo en la cama prolongado, por ejemplo, tetrapléjicos y parapléjicos que padecen pérdida de la piel debido a los efectos de presión localizada. Las úlceras de presión resultantes presentan erosión dérmica y pérdida de la epidermis y apéndices cutáneos.

El biotejido de colágeno comprendido en la invención también se puede usar en el tratamiento de quemaduras, que incluyen, pero no se limitan a quemaduras de primer grado, quemaduras de segundo grado (quemaduras de espesor parcial), quemaduras de tercer grado (quemaduras de espesor total), infección de heridas por quemaduras, infección de heridas por quemaduras extirpadas y sin extirpar, infección de heridas de injertos, infección del sitio donante, pérdida del epitelio de una herida por quemadura previamente injertada o curada o sitio donante de injerto de piel, e impétigo por herida por quemadura.

5.4.1.3 INGENIERÍA TISULAR

En el presente documento se desvela el uso del biotejido de colágeno comprendido en la invención como un vehículo para el transporte de células de piel cultivadas, por ejemplo, como soporte para el crecimiento y diferenciación del epitelio. En ciertos casos, para poblar el biotejido con células para formar tejidos y/o órganos (es decir, que se asemejan en el aspecto superficial o en la estructura a cualquiera de los órganos o glándulas del organismo), el biotejido se puede tratar con factores de adhesión celular para aumentar la unión de células al biotejido durante el proceso para repoblar el biotejido con tales nuevas células. En ciertos casos, el alcance de la unión de las células aumenta mediante el tratamiento de la membrana amniótica con suero, por ejemplo, suero humano o bovino fetal). En otras realizaciones, el alcance de la unión de las células aumenta mediante el tratamiento de la membrana amniótica con fibronectina.

El biotejido de colágeno comprendido en la invención se puede usar en técnicas de regeneración guiada de tejidos, por ejemplo, para regenerar o sustituir tejido enfermo o dañado. En el presente documento se desvela el uso del biotejido de la invención mediante el implante de forma directa del biotejido en el sitio del tratamiento o mediante la formación de un dispositivo protésico. El biotejido de colágeno de la invención es particularmente útil en cualquier situación, tal como después de cirugía especialmente cirugía oral o dental (tal como se describe con más detalle en la Sección 5.4.2.2), en la que se desea el aumento de la curación de heridas y/o sustitución de la dermis. La utilidad del biotejido de colágeno comprendido en la invención en la generación guiada de tejidos se debe en parte a su capacidad para proporcionar condiciones que evitan el crecimiento hacia adentro de otros tejidos en el área en la que se necesita regeneración.

Por ejemplo, cuando se retira una parte básica de una raíz dental debido a caries o enfermedad, se desea que se produzca regeneración de hueso sano para sustituir el tejido de hueso retirado. Sin embargo, se ha encontrado que el hueco que deja la retirada de hueso se rellena rápidamente con tejido conjuntivo y que este crecimiento hacia el interior del tejido conjuntivo evita de forma eficaz la regeneración ósea. Para evitar dicho crecimiento hacia el interior, el biotejido de colágeno comprendido en la invención se puede insertar de forma quirúrgica alrededor de la periferia del hueco de la herida. El biotejido impide o dificulta la invasión de hueco de la herida por tipos de células no deseadas y de este modo permite que las células preferentes crezcan en el cuerpo, curando de ese modo de la herida.

Tal como se desvela en el presente documento, el biotejido de colágeno tiene utilidad como un trasplante para la reconstrucción de la superficie ocular por ejemplo en un sujeto con síndrome de Stevens Johnson, insuficiencia de células madre límbicas derivadas de una quemadura química límbica, o con quemaduras químicas y/o térmicas. Se espera que el biotejido comprendido la invención tenga un aumento de la utilidad clínica para estimular, por ejemplo, la epitelialización. Se espera que el biotejido de la invención tenga un aumento de la utilidad clínica con respecto a las membranas amnióticas usadas en la técnica confines de ingeniería tisular, véase, por ejemplo, Gomes *et al.*, 2003, *Ophthalmology*, 119: 166-73; Ti *et al.*, 2001, *Ophthalmology*, 108:1 209-1217; Meller *et al.*, 2000, *Ophthalmology*, 107: 980-9; Gris *et al.*, 2002 *Ophthalmology*, 109: 508-12; Koizumi *et al.*, 2000, *Invest. Ophthal. and Visual Science*, 41: 2506-13; Pires *et al.*, 1999, *Arch. Ophthalmol.* 117: 1291-7; Tseng *et al.*, 1998, *Arch. Ophthalmol* 116: 431:441; Heiligenhaus *et al.*, 2001 *Invest. Ophthal. and Visual Science* 42: 1969-74; Anderson *et al.*, 2001, *Br. J. Ophthalmol* 85: 567-75.

En el presente documento se desvela la población del biotejido de colágeno con células vivas, que incluyen, pero no se limitan a células de tejido adultas, células autólogas, y células madre. Las células madre para usó en los métodos de la invención pueden ser células totipotentes, pluripotentes, o específicas de tejidos diferenciadas. Las células madre para uso en los métodos de la invención se pueden obtener con métodos convencionales conocidos por un experto en la materia. Preferentemente, las células madre se recogen de acuerdo con el método que se desvela en la Solicitud de Estados Unidos N° 10/74.976, presentada el 13 de febrero de 2002. Las células no tienen su origen en embrión humano.

En el presente documento se desvela el uso del biotejido de colágeno comprendido en la invención (por ejemplo, como armazones tridimensionales) para el desarrollo de tejido y órganos sometidos a ingeniería biológica, que incluyen, pero no se limitan a, vasos sanguíneos, válvulas cardíacas, hígado, páncreas, y ligamentos. Aunque no se pretende quedar ligado por ningún mecanismo de acción, la utilidad del biotejido comprendido en la invención en forma de un tejido sometido a ingeniería biológica se debe en parte, a su propiedad hemostática para estimular la coagulación sanguínea. El biotejido comprendido en la invención es particularmente útil para prótesis vasculares y como un trasplante en cirugía vascular. El biotejido comprendido en la invención se puede usar, por ejemplo, como una circunferencia que cubre los sitios anastomóticos de los vasos sanguíneos (o vasos para injertos) durante procedimientos de cirugía vascular para evitar pérdidas de sangre de las líneas de sutura y predicar que el

organismo forme adherencias en el material de sutura.

5.4.2 MÉTODOS DE USO DE LOS BIOTEJIDOS DE COLÁGENO EN PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS

5 En el presente documento se desvela el uso del biotejido de colágeno comprendido en la invención en forma de un injerto quirúrgico. En el presente documento se desvela un injerto quirúrgico que comprende un biotejido de colágeno comprendido en la invención o un laminado del mismo. El presente documento también se desvelan métodos para preparar y usar el injerto quirúrgico.

10 En el presente documento se desvela un método para usar el injerto quirúrgico en un procedimiento quirúrgico, de modo que el injerto quirúrgico se aplica directamente al sitio quirúrgico del sujeto, por ejemplo, un sitio interno, o un sitio externo. El de biotejido de colágeno se usa como un injerto quirúrgico durante un procedimiento quirúrgico tal como se desvela con más detalle a continuación, por ejemplo, para prevenir pérdidas de sangre de las líneas de sutura y para evitar que el organismo forme adherencias en los materiales de sutura. El injerto quirúrgico se usa como una cubierta en los sitios anastomóticos, por ejemplo, del tracto GI durante la cirugía GI para evitar pérdidas de fluido intestinal y biliar de las líneas de sutura y para evitar que el organismo forme adherencias en los materiales de sutura.

15 En el presente documento se desvela el uso del biotejido como un injerto o apósito para cubrir heridas cutáneas quemadas o quirúrgicas; al evitar la adherencia en todas las cirugías intra peritoneales u otra reconstrucción de las superficies serosas que cubren el abdomen, cavidad del pecho y pericardio; para reconstruir todas las superficies de mucosa que revisten las cavidades oral y nasal, tractos respiratorios, tractos gastrointestinales, y tractos urogenitales; como un sustrato para apoyar la reparación en cirugías cerebrales; como un sustrato para estimular la regeneración de los nervios en los sistemas nerviosos central y periférico; y para reconstruir tejidos blandos para evitar la adherencia en reparaciones de articulaciones o tendones.

25 En el presente documento se desvela la impregnación del injerto quirúrgico con una o más biomoléculas, preferentemente un agente terapéutico, dependiendo del uso quirúrgico pretendido en particular. Tales biomoléculas incluyen pero no se limitan a, antibióticos (tales como Clindamicina, Minociclina, Doxiciclina, Gentamicina), hormonas, factores de crecimiento, agentes antitumorales, agentes antifúngicos, agentes antivirales, medicamentos para el dolor, antihistamínicos, agentes antiinflamatorios, agentes antiinfecciosos que incluyen, pero no se limitan a plata (tales como sales de plata, que incluyen, pero no se limitan a nitrato de plata y sulfadiazina de plata), plata elemental, antibióticos, enzimas bactericidas (tal como lisozoma), agentes para curación de heridas (tales como citoquinas que incluyen, pero no se limitan a PDGF, TGF; timosina), Ácido hialurónico como un agente para curación de heridas, selladores de heridas (tales como fibrina con o sin trombina), atractores celulares y reactivos para formación de armazones (tales como fibronectina) y similares. En un ejemplo específico, el biotejido de colágeno se puede impregnar con al menos un factor de crecimiento, por ejemplo, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento epitelial, *etc.* El biotejido también se puede impregnar con moléculas orgánicas pequeñas tales como inhibidores específicos de procesos bioquímicos en particular por ejemplo, inhibidores de receptores de membrana, inhibidores de quinasas, inhibidores del crecimiento, fármacos anticáncer, antibióticos, *etc.*

35 En el presente documento se desvela la población del injerto quirúrgico con células vivas, que incluyen, pero no se limitan a, células madre, células madre totipotentes, células madre pluripotentes, células madre multipotentes, células madre específicas de tejidos, células madre de tipo embrionario, células precursoras comprometidas, células de fibroblastoides. En otras realizaciones, la invención incluye la población del injerto quirúrgico de la invención con clases específicas de células precursoras que incluyen, pero no se limitan a condrocitos, hepatocitos, células hematopoyéticas, células del parénquima pancreático, neuroblastos, células precursoras de músculo. Las células no tienen su origen en embrión humano.

5.4.2.1 OFTALMOLOGÍA

45 El biotejido de colágeno comprendido en la invención tiene utilidad clínica y terapéutica en el tratamiento de una enfermedad o trastorno relacionados con los ojos. El biotejido de colágeno comprendido en la invención es particularmente útil para el tratamiento y/o prevención de enfermedades de la superficie ocular que incluyen, pero no se limitan a, úlceras/perforaciones de córnea, queratopatía bullosa, dermoides/tumores oculares, pterigión primario, defecto del epitelio de córnea persistente, quemaduras alcalinas agudas y crónicas, quemaduras térmicas, aniridia, queratitis atópica, deficiencia de células madre límbicas idiopáticas, pannus corneal, neovascularización, fusión corneal reumatoide, penfigoide cicatricial ocular, ampolla de filtración con pérdidas, tubo de la válvula de Ahmed expuesto, celulitis por *Serratia* en el simbléfaron posterior, síndrome de Stevenson Johnson agudo y crónico. El biotejido de colágeno comprendido en la invención es particularmente eficaz para estimular la curación de defectos persistentes del epitelio corneal con ulceración; estimular la epitelialización; facilitación del crecimiento de células epiteliales y madre que no tienen su origen en embrión humano; reducción de inflamación y dolor, inhibición de angiogénesis y formación de cicatrices; restauración del fenotipo epitelial; y como un sustrato alternativo al autoinjerto de conjuntiva durante la retirada de la "esclerótica desnuda" del pterigión.

55 En el presente documento se desvela el trasplante usando el biotejido de colágeno comprendido en la invención para el tratamiento de queratopatía bullosa sintomática, preferentemente en seres humanos, lo más preferentemente

en seres humanos con potencia visual escaso. Se espera que el biotejido comprendido en la invención tenga un aumento de la utilidad terapéutica y clínica con respecto a otros tratamientos convencionales usados en la técnica para el tratamiento de queratopatía bullosa sintomática, específicamente, construcción de colgajo conjuntival. La ventaja del trasplante usando el biotejido comprendido en la invención con respecto a procedimientos convencionales usados en la técnica para el tratamiento de queratopatía bullosa sintomática, específicamente, en construcción de colgajo conjuntival, incluyen por ejemplo, reducción del dolor, facilidad de rendimiento, un aspecto cosméticamente más aceptable, y una reducción de las complicaciones tales como ptosis y deficiencia de células madre limáticas. El biotejido de colágeno comprendido en la invención proporciona una alternativa mejor a los colgajos conjuntiva de estar a estimular la curación de defectos del epitelio de la córnea con ulceración; un método mejor para la reconstrucción de la superficie de la conjuntiva para lisis del simbléfaron; un método mejor para la retirada quirúrgica de tumores, lesiones, o formación de cicatrices de la superficie conjuntival o corneal; un método mejor para cirugías de glaucoma mediante la corrección de pérdidas en ampollas; como un sustrato mejor alternativo al auto injerto de conjuntiva durante la retirada de la "esclerótica desnuda" del pterigión; y un método mejor para prevenir la reaparición de queratopatía de banda.

En el presente documento se desvela el uso del biotejido como un injerto quirúrgico oftalmológico. En el presente documento se desvela la preparación de injertos que comprenden el biotejido comprendido en la invención que comprende adicionalmente uno o más agentes terapéuticos que se pueden administrar al receptor cuando se unen al receptor. Ejemplos de agentes terapéuticos que se pueden administrar usando el biotejido comprendido en la invención incluyen, pero no se limitan a, pilocarpina, eritromicina, gentamicina, vancomicina, tobramicina, netilmicina, sulfato de polimixina B, trimetoprim, amfotericina B, agentes anticáncer, antibióticos, ciclosporina, etc.

El biotejido de colágeno comprendido en la invención también tiene utilidad para reducir la turbidez de la córnea inducida por queratectomía fotorrefractiva/terapéutica con láser de excímeros.

El biotejido de colágeno comprendido en la invención para uso en procedimientos oftálmicos en se puede proporcionar en diversas configuraciones que incluyen, pero no se limitan a insertos, protecciones, partículas, geles, inyecciones acuosas, esponjas, películas.

En el presente documento se desvelan técnicas de cirugía convencionales, conocidas por un experto en la materia, para injertos oftálmicos.

Un protocolo a modo de ejemplo para uso de un biotejido de colágeno comprendido en la invención en forma de un injerto quirúrgico oftálmico puede comprender las siguientes etapas: se retiran los tejidos de córnea y/o conjuntiva dañados; se proporciona el injerto quirúrgico, preparado de acuerdo con los métodos que se desvelan en el presente documento en condiciones estériles, y se recorta con una técnica de mano libre para cubrir el epitelio de la córnea o la esclerótica desnuda. Usando una sutura, el injerto se ancla a la unión del esclerótico desnuda y la conjuntiva; se colocan suturas fundamentales; y las suturas rotas se usan para crear una distribución uniforme de la tensión sobre la superficie del injerto; de manera que se evita cualquier espacio entre el injerto y la esclerótica o córnea del receptor. En la unión del injerto y el huésped, el borde libre del injerto debe permanecer bajo la membrana conjuntival del receptor para permitir el deslizamiento del epitelio huésped a través de la lámina basal en el punto de unión con el tejido de un donante, de lo contrario el destinatario extruye el injerto.

5.4.2.2 DENTAL

El biotejido de colágeno comprendido en la invención tiene utilidad particular en odontología, por ejemplo, cirugía periodontal, regeneración criada de tejidos para regeneración del tejido periodontal, regeneración guiada ósea, y cubierta de la raíz. En el presente documento se desvela el uso del biotejido de colágeno comprendido en la invención para estimular la regeneración de defectos intraóseos periodontales, que incluyen, pero no se limitan a defectos periodontales bilaterales emparejados, defectos intraóseos interdientales, defectos intraóseos de 3 paredes profundas, defectos intraóseos de 2 paredes, y defectos intraóseos 2 y 3. Se espera que el biotejido de colágeno comprendido en la invención tenga un aumento de la utilidad terapéutica y un aumento de los parámetros clínicos para el tratamiento de defectos intraóseos periodontales con respecto a otras técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, uso de membranas de colágeno reticuladas tales como las que se desvelan en Quteish *et al.*, 1992, *J. Clin. Periodontol.* 19 (7): 476-84; Chung *et al.*, 1990, *J. Periodontol.* 61 (12): 732-6; Mattson *et al.*, 1995, *J. Periodontol.* 66 (7): 635-45; Benque *et al.*, 1997, *J. Clin. Periodontol.* 24 (8): 544-9; Mattson *et al.*, 1999, *J. Periodontol.* 70 (5): 510-7). Los ejemplos de parámetros clínicos que mejoran usando el biotejido de colágeno comprendido en la invención incluyen, pero no se limitan a, puntuaciones del índice de placa y gingival, profundidad del bolsillo de sonda, profundidad de la unión de la sonda, y clasificación de la implicación de furcación y defecto óseo, que son conocidos por un experto en la materia.

En el presente documento se desvela el uso del biotejido comprendido en la invención en el tratamiento de defectos de furcación de clase II que incluyen, pero no se limitan a defectos bilaterales, defectos de furcación molar mandibular de Clase II emparejados con la boca, y defecto de furcación bilateral mandibular. La utilidad del Biotejido de colágeno comprendido en la invención para tratar defectos de furcación de clase II se pueden explicar en parte por su capacidad para regenerar el periodontio perdido en defectos de furcación. Se espera que el biotejido comprendido en la invención tenga un aumento de la utilidad terapéutica y clínica con respecto a las membranas de

colágeno usadas en la técnica para el tratamiento de defectos de furcación de clase II, tales como los que se desvelan en Paul *et al.*, 1992, *Int. J. Periodontics Restorative Dent.* 12: 123-31; Wang *et al.*, 1994, *J. Periodontol.* 65: 1029-36; Blumenthal, 1993, *J. Periodontol.* 64: 925-33; Black *et al.*, 1994, *J. Periodontol.* 54: 598-604; Yukna *et al.*, 1995, *J. Periodontol.* 67: 650-7).

5 En el presente documento también se desvela el uso del biotejido comprendido en la invención en procedimientos de cubierta de raíces. La utilidad del biotejido comprendido en la invención en la cubierta de raíces se puede explicar en parte debido su capacidad para sustituir tejido perdido, dañado o enfermo en base a los principios de la regeneración guiada tisular. Se espera que el biotejido comprendido en la invención tenga un aumento de la utilidad clínica en la cubierta de raíces en comparación con las membranas de colágeno usadas en la técnica tradicionalmente para cubierta de raíces tales como las que se desvelan en Shieh *et al.*, 1997 *J. Periodontol.*, 68: 770-8; Zahedi *et al.*, 1998 *J. Periodontol.* 69: 975-81; Ozcan *et al.*, 1997 *J. Marmara Univ. Dent. Fa.* 2: 588-98; Wang *et al.*, 1997 *J. Dent. Res.* 78 (Edición Especial): 119 (Res. 106), por razones que se han mencionado anteriormente.

15 En el presente documento también se desvela el uso del biotejido de colágeno en un sujeto con una enfermedad periodontal que incluye, pero no se limita a, periodontitis y gingivitis. El biotejido comprendido en la invención también tiene utilidad clínica como un adyuvante para procedimientos de raspado y alisado radicular. En el presente documento se desvela el tratamiento de un sujeto con una enfermedad periodontal usando un biotejido de colágeno comprendido en la invención. Un método a modo de ejemplo para el tratamiento de una enfermedad periodontal en un sujeto con usando un biotejido de colágeno comprendido en la invención comprende insertar un biotejido de colágeno, que se impregna preferentemente con un antibiótico tal como gluconato de clorhexidina, en uno o más bolsillos periodontales en el sujeto, por ejemplo, mayores o iguales a 5 mm. Preferentemente, el biotejido de colágeno es biodegradable.

20 El biotejido de colágeno comprendido en la invención para uso en odontología se puede impregnar con una o más biomoléculas dependiendo del tipo de trastorno dental que se está tratando. Cualquier biomolécula conocida en la técnica para el tratamiento de trastornos dentales está incluida en los métodos y composiciones de la invención. Tal como se desvela en el presente documento, el biotejido de colágeno usado en el tratamiento de un trastorno dental asociado con una infección se puede impregnar con uno o más antibióticos, que incluyen, pero no se limitan a doxiciclina, tetraciclina, gluconato de clorhexidina, y minociclina.

5.4.2.3 NEUROLOGÍA

30 El biotejido de colágeno comprendido en la invención también es útil para la reparación de nervios lesionados, particularmente en la reparación de nervios periféricos seccionados, y procedimientos neuroquirúrgicos. En el presente documento se desvela el biotejido de colágeno, por ejemplo, en sustituciones durales y en la reparación de los nervios periféricos. El biotejido de colágeno comprendido en la invención tiene mayor utilidad clínica como un sustituto dural o en la reparación de nervios al contrario que los otros métodos usados en la técnica, por ejemplo, Berger *et al.*, 1970, *Acta. Neurochir.* 23: 141; Ducker *et al.*, 1968, *Mil Med.* 133: 298; Patentes Estados Unidos N° 4.778.467; N° 4.883.618; N° 3.961.805; N° 5.354.305, por las razones que se han expuesto anteriormente.

35 El biotejido de colágeno comprendido en la invención se puede usar como una prótesis alrededor de la anastomosis nerviosa, por ejemplo se puede usar para envolver la anastomosis del nervio periférico. El biotejido de colágeno comprendido en la invención tiene una utilidad particular en la reparación de nervios, por ejemplo, al estimular la formación de un armazón de tejido conjuntivo longitudinal a través del área de reparación y de este modo da lugar a un patrón longitudinalmente de regeneración de células de la vaina y axonales.

40 La reparación de los nervios periféricos se realiza normalmente usando suturas en un procedimiento conocido como neurografía (Jennings *et al.*, 1955, *Surgery*: 206). Sin embargo, este enfoque ha tenido un éxito limitado dado que los métodos de sutura de nervios lesionados es difícil. Por lo tanto, el biotejido de colágeno comprendido en la invención puede proporcionar una alternativa a un método sin suturas para la reparación de nervios, a través del cual, por ejemplo, los extremos del nervio se incluyen en un dispositivo protésico tubular que comprende el biotejido de la invención, y por lo tanto proporciona generación a los extremos seccionados en la cercanía.

5.4.2.4 UROLOGÍA

45 El biotejido de colágeno comprendido en la invención tiene una utilidad en particular en la corrección de la incontinencia urinaria. La incontinencia urinaria resulta de la insuficiencia de la uretra para permanecer cerrada durante el almacenamiento. La causa puede ser extrínseca, por ejemplo, escaso apoyo anatómico de la uretra y cuello de la vejiga dando como resultado incontinencia y responde a la resuspensión del suelo pélvico. Como alternativa, la insuficiencia de la uretra puede ser intrínseca, es decir, mala función de la uretra. Tradicionalmente, la incontinencia urinaria se corrige usando agentes para aumentar el volumen tales como colágeno, grasa, silicona (Véase, la revisión de Lightner, 2002, *Current Opinion in Urology*, 12 (4): 333-8). El biotejido de colágeno comprendido en la invención tiene una mayor utilidad, es decir, mejora la continencia, con respecto a los agentes para aumentar el volumen que se describen en la técnica. Además, el biotejido de colágeno comprendido en la invención tiene una mayor utilidad terapéutica, por ejemplo, reducción de las complicaciones locales, reducción de la infección del tracto urinario, ninguna reacción huésped, durabilidad fiable, y mayor seguridad.

La utilidad del biotejido de colágeno comprendido en la invención para corregir la incontinencia urinaria se debe, en parte, a las características físicas únicas del biotejido de colágeno tal como se describe en el presente documento, en particular, su no inmunogenicidad. Tal como se desvela en el presente documento, el biotejido de colágeno se usa como un implante, por ejemplo, como un implante de uretra. Aunque no se pretende quedar ligado a teoría alguna en particular, el biotejido de colágeno comprendido en la invención puede tener un aumento de la utilidad terapéutica al aumentar, por ejemplo, la presión del cierre de la uretra y la resistencia a las pérdidas pasivas de orina.

5.4.2.5 ORTOPEdia

El biotejido de colágeno comprendido en la invención se puede usar en procedimientos de cirugía ortopédica. Tal como se desvela en el presente documento, el biotejido de colágeno se puede usar para defectos ortopédicos, por ejemplo, defectos adquiridos o congénitos. La reconstrucción de los defectos locales que resultan de traumatismos o reanimación quirúrgica de un tumor óseo es un problema principal en la cirugía ortopédica o maxilofacial. Por lo general, se han usado sustitutos de hueso sintético o membranas de colágeno debido en parte a sus actividades osteoinductoras (Véase, por ejemplo, Rao *et al.*, 1995, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* 7 (7): 623-45). Sin embargo, un problema común ha sido una infección sistémica como resultado del material implantado. El biotejido de colágeno comprendido en la invención, sin embargo, es ventajoso con respecto al material usado en la técnica, particularmente debido a su baja inmunogenicidad como un sustituto óseo para uso en defectos ortopédicos. Tal como se desvela en el presente documento, el biotejido de colágeno se puede usar como una prótesis para la reconstrucción de tendones. Tal como se desvela en el presente documento, el biotejido de colágeno comprendido en la invención se puede usar como una prótesis para una sustitución ósea.

5.4.2.6 CIRUGÍA CARDIOVASCULAR

El biotejido de colágeno comprendido en la invención se puede usar en procedimientos de cirugía cardiovascular, por ejemplo, como una prótesis para la construcción de vasos grandes y pequeños; para la reparación de malformaciones congénitas de los pasos y válvulas dañadas.

El biotejido comprendido en la invención tiene una utilidad en particular como un trasplante en cirugía vascular, por ejemplo, trasplante de venas o arterias. La utilidad del biotejido en cirugía vascular se debe, en parte, a su no toxicidad, no inmunogenicidad; estabilidad; facilidad de manipulación; característica antitrombogénica; porosidad mínima del implante de la pared celular; disponibilidad en diversos tamaños; reproducibilidad del material. Tal como se desvela en el presente documento, el biotejido comprendido en la invención se puede usar como un sustituto de válvula.

5.4.2.7 ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS

El biotejido de colágeno comprendido en la invención se puede usar como un vehículo para la administración de fármacos para la administración controlada de un fármaco, por ejemplo, un agente terapéutico. En algunas realizaciones, el biotejido de colágeno administra el uno o más agentes terapéuticos a un sujeto, preferentemente un ser humano. Los agentes terapéuticos incluidos dentro del alcance de la invención son proteínas, péptidos, polisacáridos, conjugados de polisacáridos, vacunas basadas en la genética, vacunas atenuadas vivas, células completas. Un ejemplo no limitante de fármacos para uso en los métodos de la invención son antibióticos, agentes anticáncer, agentes antibacterianos, agentes antivirales; vacunas; anestésicos; analgésicos; agentes antiasmáticos; agentes antiinflamatorios; antidepresivos; agentes antiartríticos; agentes antidiabéticos; antipsicóticos; estimulantes del sistema nervioso central; hormonas; inmunosupresores; relajantes musculares; prostaglandinas.

El biotejido de colágeno se puede usar como un vehículo de administración para la administración controlada de una o más moléculas pequeñas a un sujeto, preferentemente un ser humano. Tal como se desvela en el presente documento, el biotejido de colágeno administra la una o más moléculas pequeñas a un sujeto, preferentemente un ser humano. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "molécula pequeña", y expresiones análogas, incluyen, pero no se limitan a, péptidos, peptidomiméticos, aminoácidos, análogos de aminoácidos, polinucleótidos, análogos de polinucleótidos, nucleótidos, análogos de nucleótidos, compuestos orgánicos o inorgánicos (es decir, incluyendo compuestos heteroorgánicos y organometálicos) que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 10.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 5.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 1.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 500 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 100 gramos por mol, y sales, ésteres, y otras formas farmacéuticamente aceptables de tales compuestos. Además se incluyen sales, ésteres, y otras formas farmacéuticamente aceptables de tales compuestos.

Tal como se desvela en el presente documento, el biotejido de colágeno comprendido en la invención como un vehículo para la administración de fármacos da como resultado un aumento de la absorción del fármaco; aumento del perfil farmacocinético, y distribución sistémica del fármaco con respecto a los otros sistemas de administración de fármacos conocidos en la técnica. Por aumento de fármaco cinética se hace referencia a que se consigue un

5 aumento del perfil farmacocinético tal como se mide, por ejemplo, con parámetros farmacocinéticos convencionales tales como tiempo para conseguir una concentración máxima en plasma ($T_{m\acute{a}x}$); magnitud de la concentración máxima en plasma ($C_{m\acute{a}x}$); tiempo para conseguir una concentración en sangre o en plasma detectable (T_{lag}). Por aumento de la absorción se hace referencia a que la absorción del fármaco aumenta tal como se mide con tales parámetros. La medida de los parámetros farmacocinéticos se realiza de forma rutinaria en la técnica.

6. Ejemplos

6.1 MÉTODO PARA PRODUCIR EL BIOTEJIDO DE COLÁGENO

MATERIALES

Los siguientes materiales se usaron en la preparación del biotejido de colágeno.

- 10 Materiales/Equipo
- Copia de Registro de Administración
 - Copia de Material/Historia de Salud Familiar/Consentimiento Informado
 - Obtener Etiqueta con Código de Barras (número de ID del Donante)
 - N° de Recogida (Se asigna un número secuencial al material entrante)
- 15
- Registro de Procesamiento de Tejidos (N° de ID del Documento ANT-19F); se mantiene un registro detallado del procesamiento de cada número de lote
 - Placenta Humana (con menos de 48 al comienzo del procesamiento)
 - Elementos de sujeción/Hemóstatos Quirúrgicos Estériles
 - Tijeras Estériles
- 20
- Bisturís Estériles
 - Raspador de Células Estéril (Nalgene NUNC Int. R0896)
 - Gasa Estéril (PSS 4416 no estéril, esterilizada)
 - Bandejas de Acero Inoxidable para Aclarado Estériles
 - Bandejas de Acero Inoxidable para Procesamiento Desinfectadas
- 25
- Cesta de Plástico Desinfectada
 - Solución de NaCl al 0,9 % Estéril (Baxter 2F7124)
 - Agua Estéril (Milli Q más 09195 o Baxter 2F7113)
 - Envases para Muestras Estériles (VWR 15704-014)
 - Equipo de Protección Personal (incluyendo guantes estériles y no estériles)
- 30
- Habitación Limpia Certificada
 - Solución de Descelularización Preparada Previamente (células D); monohidrato del ácido desoxicólico al 0,01-1 %
 - Recipiente Desinfectado
 - Plataforma Oscilante (Modelo 100 de VWR)
- 35
- Cronómetro (VWR 21376890)
 - Malla para Marco de Plástico Desinfectada
 - Film para Envolver de PVC
 - Bomba de Vacío (Schuco-Vac 5711-130)

- Secador de Gel (es decir, secador de calor; Modelo 583 de BioRad)
 - Tabla de Cortar de Acero Inoxidable Desinfectada
 - Bolsas para Envasado
 - Regla de Acero Inoxidable Estéril (General Tools MFG. Co 1201)
- 5
- Termómetro Digital Trazable (Modelo 61161-364, Control Company)
 - Sellador Automático Accu-Seal (Accu-Seal, Modelo 630-1B6)

10 La futura madre fue explorada en el momento del nacimiento para enfermedades de transmisión tales como VIH, VHB, VHC, HTLV, Sífilis, CMV y otros virus, y otros patógenos que podrían contaminar los tejidos de placenta que se están recogiendo. Solamente se usaron los tejidos tomados de donantes cuyas madres dieron negativo o no reactivo a los patógenos mencionados anteriormente para producir el biotejido de colágeno.

15 Después del nacimiento normal, la placenta, el cordón umbilical y la sangre del cordón umbilical se expulsaron espontáneamente del útero en contracción. La placenta, el cordón umbilical y la sangre del cordón umbilical se recogieron después del nacimiento. Los materiales se transportaron al laboratorio donde se procesaron en condiciones asépticas en una habitación Limpia con un sistema de filtración HEPA, que se encendió al menos una hora antes del procesamiento. Se usaron guantes (estériles o no estériles, según el caso) en todo momento durante la manipulación del producto. Todos los segmentos (residuos) no usados del amnios/corión y líquidos contaminados, generados durante el procesamiento del tejido, se eliminaron lo antes posible.

ETAPA I.

20 Se estableció un *campo* estéril con láminas de Steri-Wrap estéril y se colocaron en el mismo los siguientes instrumentos y accesorios para el procesamiento.

- Envase de bandeja estéril
- Raspador de Células estéril
- Bisturí estéril
- Bandeja de procesamiento desinfectada

25 El N° de ID del recipiente estéril se registró en el Registro de Procesamiento.

30 La placenta se retiró del recipiente de transporte y se colocó en la bandeja de acero inoxidable desinfectada. Usando elementos de sujeción y tijeras quirúrgicas, se cortaron aproximadamente 5 cm del cordón umbilical del disco placentario. El cordón umbilical se colocó en un recipiente estéril separado para su procesamiento adicional. El recipiente se marcó con Código de Barras con ID del Tejido; y se identificaron el material y la solución o soluciones de almacenamiento presentes (por ejemplo, tipo de medios). En algunos casos, se descartaba el cordón umbilical si no era necesario para otros proyectos.

Comenzando desde el borde de la membrana de la placenta, el amnios se separó del corión usando disección para formar extremos rombos con los dedos. Esto se hizo antes de cortar la membrana.

35 A continuación, el amnios se separó de toda la superficie del corión y disco placentario, la membrana amniótica se cortó alrededor del tronco del cordón umbilical con tijeras y se separó del disco placentario. En algunos casos, si no era posible la separación de los amnios y el corión sin desgarrar el tejido, el amnios y el corión se cortaban desde el disco placentario como una sola pieza y luego se retiran aparte.

40 El corión se colocó en un recipiente para muestras independientes para su uso para otros proyectos. El recipiente se etiquetó con el Código de Barras de ID de Tejido, el material y la solución o soluciones de almacenamiento presentes (por ejemplo, tipo de medios) se identificaron, se pusieron las iniciales y se puso la fecha.

Si cualquier pieza de amnios todavía estaba unida al disco placentario, ésta se desprendía del disco y se cortaba alrededor de del cordón umbilical con tijeras. La placenta se colocó de nuevo en el recipiente de transporte para su uso en otros proyectos.

Los datos apropiados se registraron en el Registro de Procesamiento de Tejidos.

45 La membrana amniótica se mantuvo en la bandeja con solución estéril de NaCl al 0,9 %. Preferentemente, la membrana amniótica se almacena con refrigeración durante un máximo de 72 horas desde el momento del parto antes de la siguiente etapa en el proceso.

ETAPA II.

5 La membrana amniótica se retiró del recipiente de la muestra, una pieza cada vez, y se colocó en la bandeja de acero inoxidable desinfectada. Otras piezas se colocaron en una bandeja de acero inoxidable estéril independiente rellena con agua estéril hasta que estaban listas para su limpieza. Se retiraron piezas adicionales de amnios de la bandeja de procesamiento y se colocaron en una bandeja de acero inoxidable para aclarado independiente rellena con agua estéril.

La membrana amniótica se enjuagó con agua estéril si estaba extremadamente contaminada con fluidos/materiales de sangre materna o del feto cambiando el agua estéril cuando era necesario.

10 La membrana amniótica se colocó en la bandeja de procesamiento con el lado materno hacia arriba. Usando un Raspador de Células estéril, se retiró cuidadosamente, tanto como fue posible, la contaminación visible y el material celular del lado materno del amnios. (Nota: se debería aplicar una presión mínima en esta etapa para evitar que se rompa la membrana). Se usó agua estéril para ayudar en la eliminación de las células y los restos celulares. La membrana amniótica se aclaró adicionalmente con agua estéril en la bandeja de enjuague de acero inoxidable estéril independiente.

15 Se dio la vuelta a la membrana amniótica de manera que el lado fetal estuviera hacia arriba y se colocó de nuevo en la bandeja de procesamiento y se aclaró con agua estéril. El material celular y los restos visibles se retiraron suavemente usando el Raspador de Células (Nota: Se debería aplicar una presión mínima en esta etapa para evitar que se rompa la membrana). Se usó agua estéril para ayudar en la eliminación de las células y los restos celulares.

20 La membrana amniótica se aclaró con agua estéril entre las rondas de limpieza en bandejas de aclarado estériles independientes. El tejido se limpió tantas veces (rondas de limpieza) como era necesario para retirar la mayoría, si no todo, el material celular y los restos visibles desde ambos lados de la membrana. El agua estéril se cambió de las bandejas de aclarado entre aclarados.

La bandeja de procesamiento se aclaró con agua estéril después de cada ronda de limpieza.

25 Todas las otras piezas de amnios se procesaron en la misma manera y se colocaron en el mismo recipiente. Se fijó un Código de Barras de Id del Tejido, se identificaron el material y la solución o soluciones de almacenamiento presentes (por ejemplo, tipo de medios), se añadieron las iniciales y la fecha.

La información apropiada y la fecha se registraron en el Registro de Procesamiento de Tejidos.

ETAPA III.

30 La membrana amniótica se retiró de la bandeja de aclarado, (o del recipiente de almacenamiento), el exceso de líquido se apretó suavemente con los dedos y la membrana se colocó en el recipiente de la muestra estéril. El recipiente se llenó hasta la marca de 150 ml con solución de células D asegurando que toda la membrana amniótica estaba cubierta y el recipiente se cerró.

El recipiente se colocó en el depósito en la plataforma oscilante. La plataforma oscilante se encendió y la membrana se agitó en solución de células D durante un mínimo de 15 minutos y un máximo de 120 minutos en el Ajuste N° 6.

35 Se estableció un nuevo campo estéril con nuevos instrumentos y la bandeja se desinfectó de la misma manera que en la Etapa I. El N° de ID del envase estéril se registró en el Registro de Procesamiento.

Después de finalizar la agitación, la plataforma oscilante se apagó y la membrana se retiró del recipiente. La membrana se colocó en una nueva bandeja de procesamiento de acero inoxidable estéril. Se añadió solución estéril de NaCl al 0,9 % para cubrir la parte inferior de la bandeja.

40 Usando un nuevo Raspador de Células estéril, se retiraron las células D y el material celular residual (si los hubiera) de ambos lados del tejido. Esta etapa se repitió tantas veces como fue necesario para retirar tanto como fuera posible de material celular residual visible de toda la superficie en ambos lados. La membrana se aclaró con solución estéril de NaCl al 0,9 % en una bandeja de aclarado independiente entre las rondas de limpieza. La solución estéril de NaCl al 0,9% se cambió en las bandejas de aclarado entre aclarados.

45 Después de completar la última ronda de limpieza, la membrana se aclaró con solución estéril de NaCl al 0,9 % y se colocó en el nuevo recipiente de muestras estéril lleno con la solución estéril de NaCl al 0,9 %.

Todas las piezas restantes de membrana amniótica se procesaron exactamente de la misma forma.

50 Cuando se procesaron todas las piezas de membrana amniótica y en el recipiente con la solución estéril de NaCl al 0,9 %, el recipiente se colocó en el depósito de la plataforma oscilante para su agitación durante un mínimo de 5 minutos en el ajuste N° 6. Después de finalizar la agitación, la membrana se retiró del recipiente de la muestra, la solución estéril de NaCl al 0,9% se cambió en el recipiente y la membrana se colocó de nuevo en el recipiente de la muestra.

El recipiente de la muestra se etiquetó con Código de Barras para ID de Tejidos y etiqueta de Cuarentena. Se identificaron el material y la solución o soluciones de almacenamiento presentes (por ejemplo, tipo de medios), pusieron las iniciales y la fecha. El recipiente de la muestra se colocó en una bolsa limpia con cierre de cremallera y se colocó en la nevera (entre 2 - 8 °C).

- 5 Todos los datos apropiados se registraron en el Registro de Procesamiento de Tejidos.

Cuando los resultados serológicos estuvieron disponibles, la etiqueta apropiada (Serología Negativa o Para Uso Exclusivo en Investigación) se colocó en la parte superior de la etiqueta de Cuarentena y los recipientes se separaron de los puestos en Cuarentena.

ETAPA IV.

- 10 Antes de proceder con la Etapa IV, se comprobó la Revisión Del Estado de los Tejidos para asegurarse que todos los resultados del ensayo aplicables eran negativos.

Se creó un campo estéril con lámina Steri-Wrap estéril y todos los instrumentos y accesorios estériles y desinfectados se establecieron de la misma forma que en las Etapas II y III.

- 15 La membrana se retiró de la nevera y se colocó en una nueva bandeja de procesamiento de acero inoxidable estéril. Se añadió una solución estéril de NaCl al 0,9 % para cubrir la parte inferior de la bandeja.

Todo el material y restos celulares visibles (si los hubiera) se retiraron suavemente usando un nuevo Raspador de Células estéril (Nota: se debería aplicar una presión mínima en esta etapa para evitar que se rompa la membrana). Se usó solución estéril de NaCl al 0,9 % para ayudar en la eliminación de las células y los desechos.

- 20 La membrana se aclaró en la bandeja de aclarado de acero inoxidable estéril independiente llena con solución estéril de NaCl al 0,9 %. La Solución de NaCl al 0,9% se cambió entre las rondas de limpieza. La membrana se colocó en un nuevo recipiente de muestras estériles, el recipiente se llenó con solución estéril recién preparada de NaCl al 0,9 % y se colocó en la plataforma oscilante para su agitación durante un mínimo de 5 minutos en el Ajuste N° 6.

La etapa anterior se repitió 3 veces y la solución estéril de NaCl al 0,9 % se cambió entre cada una de las agitaciones. Los datos apropiados se registraron en el Registro de Procesamiento de Tejidos.

- 25 Se retiró la membrana del recipiente de muestras, una pieza cada vez, el exceso de fluido se apretó suavemente con los dedos y la membrana se colocó en una bandeja de procesamiento estéril. La membrana se estiró suavemente hasta que estaba plana; asegurándose de que el lado fetal estaba hacia abajo.

- 30 Se preparó el marco cortando la lámina de plástico desinfectada con tijeras estériles. El tamaño del marco debería ser aproximadamente 0,5 cm más pequeño en cada dirección que el segmento de la membrana. El marco se aclaró en la bandeja de aclarado rellena con solución estéril de NaCl al 0,9 %.

El marco se puso en la superficie de la membrana ligeramente estirada y se presionó sobre ella suavemente. Es fundamental que el lado suave de del marco de plástico se coloque enfrente del tejido.

Usando un bisturí, se cortó la membrana alrededor del marco dejando aproximadamente 0,5 cm de extensión más allá de los bordes del marco. El exceso de membrana se colocó de nuevo en el recipiente de la muestra.

- 35 Los bordes de la membrana que se extienden más allá del marco se envuelven sobre los bordes del marco usando elementos de sujeción o pinzas y se colocan al lado en la misma bandeja.

La siguiente membrana se procesó de la misma manera. Es importante que el área total a secar no supere 300 cm² por secador de calor. A la vez que la pieza de membrana se 'desenmarca', las piezas sin enmarcar deberían permanecer en el recipiente en solución estéril de NaCl al 0,9 %.

- 40 Se ajustaron las temperaturas de secado de los secadores y se verificaron usando un termómetro digital calibrado con sonda extendida. La temperatura de secado se estableció en 50 °C. Los datos se registraron en el Registro de Procesamiento de Tejidos.

La bomba de vacío se encendió.

- 45 Se colocó una gasa estéril en la plataforma de secador del secador de calor, cubriendo un área ligeramente mayor que el área de la membrana enmarcada. Es importante asegurarse de que la espesor total de la capa de gasa no supere un espesor de una gasa de 4 x 4 doblada.

Una lámina de malla de marco de plástico se puso en la parte superior de la gasa. Los bordes de la malla de plástico se deberían extender aproximadamente 0,5-1,0 cm más allá de los bordes de la gasa.

- 50 La membrana enmarcada se levantó suavemente y se colocó en la plataforma del secador de calor en la parte superior de la malla de plástico con la cara de la membrana mirando hacia arriba. Esto se repitió hasta que la

cantidad máxima de membrana (sin superar 300 cm²) estuvo en la plataforma del secador de calor. (NOTA: el lado fetal del amnios está mirando hacia arriba).

Se cortó una pieza de película de envoltura de PVC lo suficientemente larga como para cubrir toda la plataforma de secado del secador de calor más 30 cm extra.

- 5 Con la bomba de vacío funcionando, toda la plataforma de secado del secador de calor cubrió suavemente con la película de plástico dejando 15 cm extendiéndose más allá de los bordes de la plataforma de secado en ambos lados. Se tuvo cuidado de que la película se ajustara fuertemente frente a la membrana y la lámina del marco (es decir, está "succionada" por el vacío) y de que no hubiera fugas de aire ni arrugas sobre el área del tejido). Posteriormente, el párpado se cerró.
- 10 La bomba de vacío se ajustó a aproximadamente -559 mm de Hg de vacío. La calibración de la bomba se registró después de 2-3 min de ciclo de secado. La membrana se secó al vacío con calor durante aproximadamente 60 minutos. Aproximadamente a los 15-30 minutos del proceso del secado, la capa de gasa estéril se substituyó en la secadora de calor con una nueva. El espesor total de la capa de gasa no debe superar un espesor de una gasa de 4 x 4 doblada.
- 15 Después del cambio, se tuvo cuidado para que la película de plástico se apretara fuertemente frente a la membrana y la lámina del marco y para que no hubiera fugas de aire y ninguna arruga sobre el área de la membrana.

La integridad del cierre hermético al vacío se comprobó periódicamente comprobando el manómetro presión de la bomba. Después de la finalización del proceso de secado, se abrió el secador por calor y la membrana se enfrió durante aproximadamente todos minutos con la bomba funcionando.

- 20 Se creó un nuevo campo estéril con Steri-wrap estéril y una tabla de cortar de acero inoxidable desinfectada debajo del mismo. En este punto se usaron guantes estériles. Con la bomba aún en marcha, la película de plástico se retiró suavemente de la lámina de membrana comenzando en la esquina y manteniendo la lámina de membrana hacia abajo con una mano enguantada. El bastidor se levantó suavemente con la membrana fuera de la plataforma de secado y se colocó en el campo estéril en la parte superior de la tabla de cortar de acero inoxidable desinfectada con la cara de la membrana hacia arriba. Usando un bisturí, la lámina de membrana se cortó haciendo una incisión a lo largo del borde de 1 - 2 mm más allá del borde del marco. La membrana se mantuvo en el lugar con una mano enguantada (guante estéril). Suavemente, la lámina de membrana se despegó del marco retirando lentamente y a continuación se colocó en el campo estéril en la tabla de corte.
- 25

- 30 Usando bisturí o tijeras afiladas, la lámina de membrana se cortó en segmentos de tamaño específico. Todas las piezas se cortaron y se aseguraron en el campo estéril antes de su envasado. Se puso una sola pieza de membrana dentro de un recipiente se puso de bolsillo interno para abrir con una mano (estéril) a la vez que se mantenía el bolsillo con la otra mano (no estéril). Se tuvo cuidado para no tocar los bolsillos con la mano 'estéril'. Cuando todas las piezas estuvieron dentro de los bolsillos internos, éstas se cerraron herméticamente. Se fijó una marca con la información apropiada (por ejemplo, N° de Pieza, N° de Lote, etc.) en la zona designada en la parte externa del bolsillo. Todas las piezas de membrana se procesaron de la misma manera. Los envases de bolsillo para abrir marcados y cerrados herméticamente se colocaron en la bolsa para cerrar con cremallera impermeable para su almacenamiento hasta que estuvieran listas para transporte a la instalación o distribuidor para su esterilización. Todos los datos apropiados se registraron en el Registro de Procesamiento de Tejidos.
- 35

6.2 EVALUACIÓN DEL BIOTEJIDO DE COLÁGENO PARA HIDRATACIÓN/CAPACIDAD DE SUTURA

- 40 Para generar una retroalimentación cualitativa y cuantitativa con respecto a la manipulación quirúrgica, periodos de hidratación y capacidad de sutura de los biotejidos comprendidos en la presente invención, se proporcionan muestras de membrana amniótica preparadas de acuerdo con los métodos de la presente invención a cuatro cirujanos de la superficie ocular experimentados, y muy respetados para su evaluación. Las muestras las evalúan los cirujanos realizando injertos de tejido en muestras de ojo de cerdo para determinar las propiedades de manipulación quirúrgica y capacidad de sutura de los biotejidos comprendidos en la invención.
- 45

Cada cirujano puede usar la siguiente metodología:

- (1) El biotejido se seca por corte para ajustar solo cuadrante del ojo del cerdo;
 - (2) El biotejido cortado se coloca en la superficie del ojo del cerdo;
 - (3) El biotejido se hidrata con solución salina estéril y se permite que el injerto se active, es decir, se vuelve hidratar, en el ojo del cerdo durante periodos de hidratación de 2, 5, 10, y 20 minutos;
 - (4) El biotejido se sutura al epitelio del ojo del cerdo con varias puntadas de sutura de vicryl 9-0; y
 - (5) Los cirujanos toman notas cualitativas con respecto a la calidad del tejido, consistencia, y capacidad de sutura de la membrana amniótica hidratada.
- 50

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar un laminado de membrana amniótica a partir de una placenta que tiene una membrana amniótica y una membrana coriónica que comprende:
- 5 (a) separar la membrana amniótica de la membrana coriónica;
(b) descelularizar la membrana amniótica; y
(c) formar capas de al menos dos de las membranas amnióticas descelularizadas en contacto entre sí de modo que se forma un laminado de membrana amniótica,
- en el que la descelularización de la membrana amniótica no forma congelación en ningún punto en la preparación de la membrana amniótica o en la puesta en contacto de la membrana con una proteasa.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente lavar la membrana amniótica descelularizada al menos una vez después de la etapa (b) y antes de la etapa (c).
3. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente secar el laminado de membrana amniótica descelularizada.
- 15 4. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente ensamblar al menos dos de dichos laminados de membrana amniótica en un armazón tridimensional complejo.
5. Un laminado de membrana amniótica que comprende al menos dos capas de una membrana amniótica deshidratada, descelularizada y libre de sustrato, en el que dicha membrana amniótica tiene una estructura terciaria y cuaternaria nativa.
- 20 6. El laminado de membrana amniótica de la reivindicación 5, en el que la membrana amniótica comprende colágeno, elastina, y fibronectina.
7. El laminado de membrana amniótica de la reivindicación 5, que comprende adicionalmente una o más composiciones de hidrogel.
- 25 8. El laminado de membrana amniótica de la reivindicación 7, en el que la composición de hidrogel comprende un polímero seleccionado entre el grupo que consiste en alcohol de polivinilo, polietilenglicol, ácido hialurónico, dextrano, y derivados o análogos de los mismos.
9. El laminado de membrana amniótica de cualquiera de las reivindicaciones 5-8, en el que se da forma al laminado en una lámina, tubo o microesfera.



FIG. 1

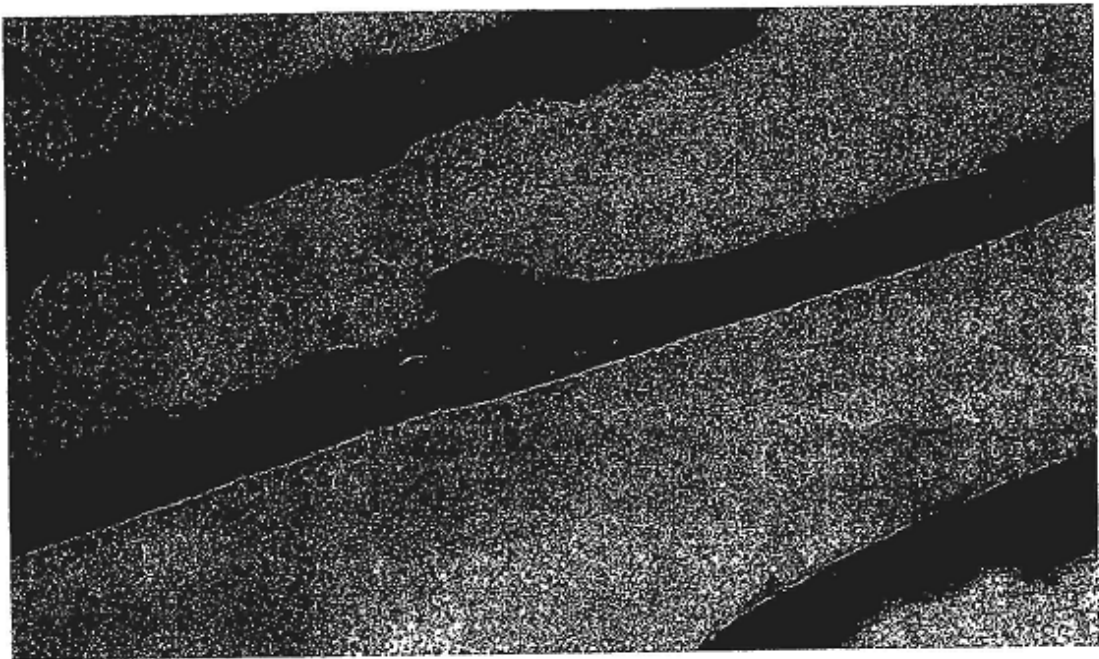


FIG. 2A

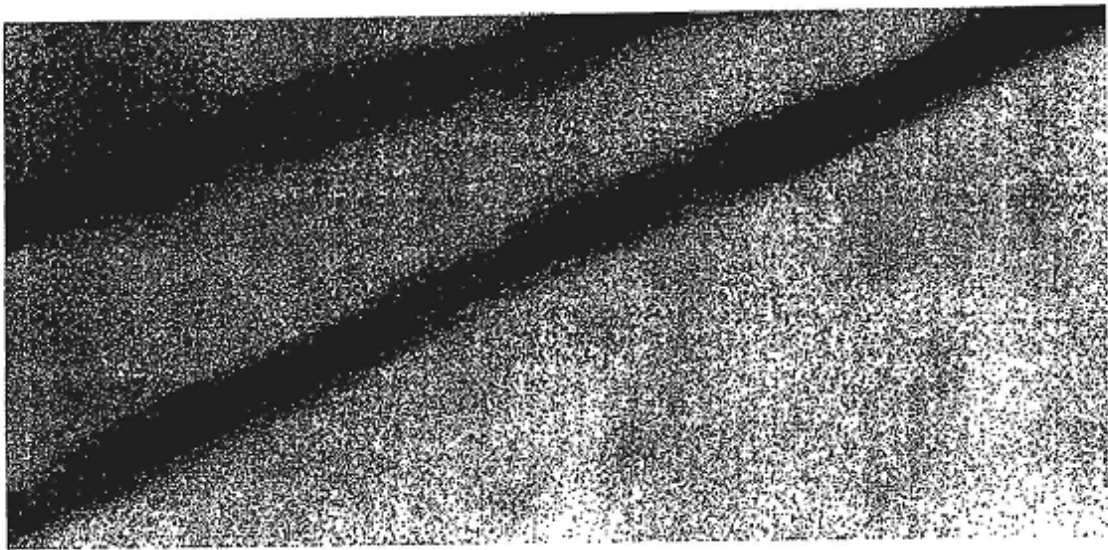


FIG. 2B

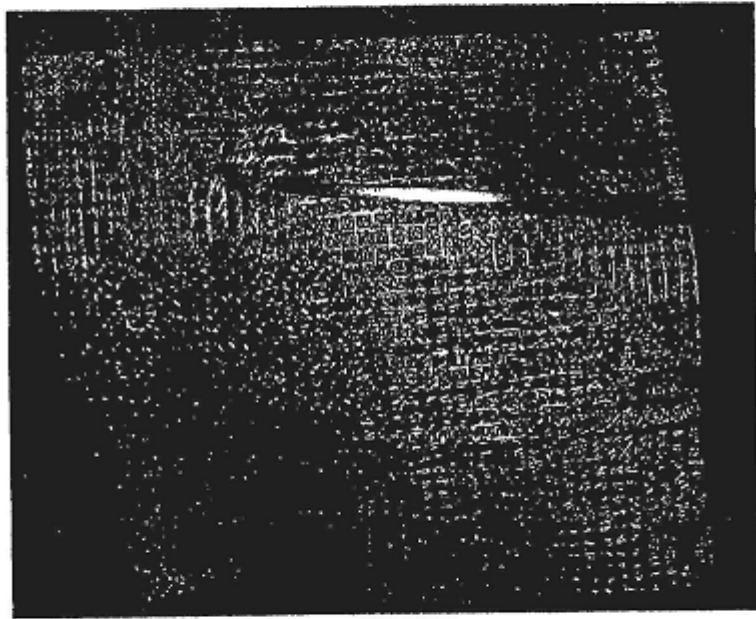


FIG. 3

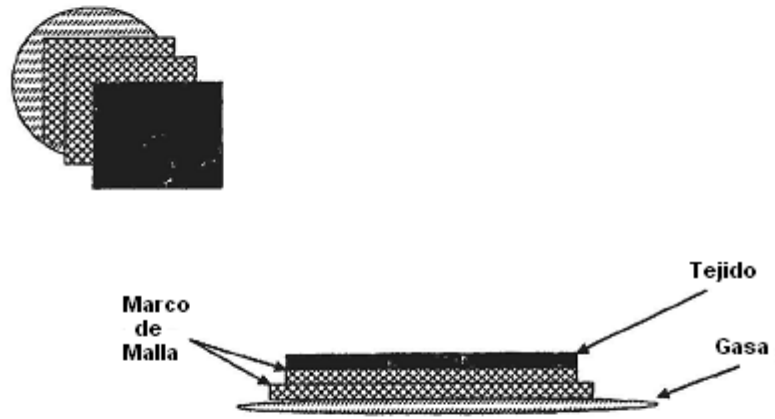


FIG. 4