

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 989**

51 Int. Cl.:

**A61L 24/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.08.2009 E 09791407 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2015 EP 2326355**

54 Título: **Método para producir un adhesivo de matriz acelular**

30 Prioridad:

**05.09.2008 US 204888**

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

**26.08.2015**

73 Titular/es:

**ETHICON, INC (100.0%)  
U.S. Route 22  
Somerville, NJ 08876, US**

72 Inventor/es:

**YANG, CHUNLIN;  
MATALENAS, THOMAS;  
SHISSIAS, RAYMOND S. y  
SPYCHAJ, KERSTIN**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 543 989 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN****Método para producir un adhesivo de matriz acelular****5 ÁREA DEL INVENTO**

Este invento se refiere en general al área de materiales biológicos naturales, más específicamente, a los métodos para hacer pegamentos bio-compatibles, tales como el bio-pegamento.

**10 ANTECEDENTES DEL INVENTO**

La matriz extracelular (ECM) ha sido reconocida por mucho tiempo como un componente estructural importante de los tejidos conectivos. El ECM es descrito generalmente como una estructura filamentososa de glicoproteínas y proteoglicanos que están adheridos a la superficie celular y suministran células con anclaje, tracción para el movimiento, y reconocimiento posicional. Actualmente, existe evidencia considerable de que las ECM elaboradas por células crean micro entornos a los cuales estas y otras células responderán diferenciándose o manteniendo su estado de diferenciación. Las ECM suministran un sustrato a la organización de células al cual adherirse. Los tejidos que se basan en material biológico y dispositivos ECM han sido usados ampliamente para una variedad de aplicaciones médicas, tales como las válvulas del corazón, sub mucosa pequeña intestinal (SIS – small intestinal submucosa) porcina, piel humana y pericardio bovino. Los tejidos conectivos alogénicos o xenogénicos tales como la piel, los tendones, el pericardio y la SIS se descelularizan (o desvitalizan) usando métodos conocidos y convencionales para suministrar un tipo de matriz extracelular que se llama matriz acelular, a la cual también se puede referir como matriz descelularizada. Durante la descelularización, las células que hicieron que se rechace el tejido son removidas mientras se retienen los componentes bioquímicos críticos y estructurales del tejido original.

El uso de matrices a celulares para ciertas aplicaciones en dispositivos médicos es conocido en la industria. Un ejemplo son los dispositivos bioprostéticos por su adherencia suave al tejido, reforzamiento o construcción. Los dispositivos tienen una lámina de una matriz extracelular generada naturalmente y una lámina de una mezcla sintética que está emparejada a la porción de la matriz extracelular generada naturalmente. Los implantes pueden secarse bajo presión del vacío que resulta en una vinculación física entre las láminas de SIS entre la mezcla y las láminas adyacentes SIS.

También se conoce el uso de una matriz acelular con un tejido biológico reforzado. Los métodos para unir o combinar el componente biológico con componentes que no son biológicos incluyen tejidos alrededor de componentes que no son biológicos, objetos no biológicos alrededor de tejidos, o tejidos adheridos dentro o cubriendo un tejido, una textura, un trenzado u otro componente textil no biológico. Los dos componentes pueden mezclarse entre sí o componentes separados pueden colocarse y enrollarse apretando uno al rededor del otro. Se pueden añadir fuerza de compresión a la estructura cubierta al incluir correas, similares al diseño de un cinturón y de un aro.

Defectos y deficiencias conocidos de los métodos convencionales para combinar estructuras sintéticas con matrices acelulares incluyen delaminación, propiedades que no permiten un buen manejo, y técnicas complicadas de procesamiento. Por lo tanto, existe la necesidad de nuevos métodos para combinar una matriz acelular con un portador sintético.

WO-A-2007050902 describe matrices de regeneración de tejidos bioabsorbibles acelulares producidas incubando productos sanguíneos acelulares.

WO-A-20070237973 describe materiales de injerto que se pueden implantar que incluyen una lámina polimérica y material matricial extracelular colocado en por lo menos una parte de la lámina polimérica porosa.

US-A-20060073592 describe métodos para almacenar matrices de tejidos acelulares en los cuales una parte sustancial del agua en las matrices se reemplaza con un agente tal como la glicerina.

**55 RESUMEN DEL INVENTO**

Asimismo, este invento suministra un método para hacer un pegamento matricial acelular que comprende de los siguientes pasos: el suministro de una matriz acelular; el aumento de la matriz acelular a una solución acuosa para elaborar una mezcla; y, la incubación de la mezcla durante un lapso que puede variar entre 10 minutos a 48 horas a una temperatura que puede variar de 70°C a 100°C para formar un pegamento matricial acelular.

El pegamento matricial acelular tiene una matriz acelular en una solución acuosa.

El pegamento puede ser utilizado para hacer una matriz acelular reforzada nueva. La matriz tiene una capa matricial acelular, una capa de pega matricial acelular, y una capa de refuerzo. Donde la capa del pegamento matricial acelular es el pegamento matricial acelular nuevo de este invento.

Este y otros aspectos y ventajas de este invento serán más evidentes después de la descripción y esquemas adjuntos a continuación.

## 5 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS ESQUEMAS**

La figura 1 es un diagrama que muestra los pasos utilizados para preparar la pega matricial acelular de este invento, y una matriz acelular reforzada.

10 La figura 2 es una imagen SEM de una matriz dérmica acelular de mezcla reforzada.

## **DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL INVENTO**

15 Los pegamentos matriciales acelulares de este invento se preparan al suministrar una matriz acelular, mezclar dicha matriz en una solución acuosa para formar una mezcla matricial acelular, y entonces incubar dicha mezcla durante un tiempo suficientemente efectivo a una temperatura suficientemente efectiva para crear el pegamento matricial acelular.

20 La matriz acelular se define aquí como un tejido que ha sido descelularizado de tal forma que los componentes nucleares y celulares se han removido de la matriz extracelular estructural. La matriz acelular se prepara de tejidos, que incluyen órganos o partes aisladas de órganos. El tejido incluye, pero no se limita a, válvulas del corazón, sub mucosa intestinal pequeña, dermis, membranas amnióticas, vejigas, omentos, pericardios, ligamentos, vasos sanguíneos, y similares. En una sección, el tejido incluye, pero no se limita al omento y la dermis. El tejido puede obtenerse de varias fuentes mamíferas que incluyen, pero no se limitan a, humanas, de cabra, porcinas, bobinas, ovinas, esquinas y similares. El tejido es decelularizado con técnicas convencionales, incluyendo pasos tales como la preservación, decelularización, lavado, descontaminación y almacenamiento de tejidos.

25 El paso de descelularización involucra comúnmente la remoción de los componentes celulares por medio de extracción usando soluciones salinas que contienen detergentes y digestión medio de endonucleasa.

30 La matriz acelular se transfiere entonces a una solución acuosa. En una sección, la matriz acelular es procesada a porciones más pequeñas antes de ser transferida a la solución acusa. La matriz acelular puede procesarse a porciones más pequeñas con métodos convencionales tales como recortes con tijeras, bisturí, o cuchillo; su trituración a forma de polvo, tal como trituración de bolas y trituración criogénica; y trituración a chorros. El procesamiento de la matriz acelular a pedazos más pequeños, tales como en forma de polvo, suministra una mayor área de superficie y por lo tanto permite una disolución más rápida a la solución acuosa. En otra sección, la matriz acelular es procesada a un polvo por medio de una trituración criogénica antes de ser añadido a la solución acuosa.

35 Las soluciones acuosas que son útiles en la práctica de este invento incluyen, pero no se limitan a, agua, amortiguadores fisiológicos y sustancias salinas. El amortiguador fisiológico incluye, pero no se limita a amortiguadores salinos, tales como el tampón de fosfato salino (PBS – phosphate buffered saline); la solución balanceada de sales de Hank, la solución salina tamponada con tris, y la solución salina tamponada de hepes. En una sección, la solución acuosa es agua.

40 En una sección, la solución acuosa incluye opcionalmente un monto suficientemente efectivo de plastificante. Los plastificantes incluyen, pero no se limitan a, glicerina, propilenglicol, polietilenglicol. En una sección, el plastificante es glicerina.

45 El pegamento matricial acelular se prepara, por ejemplo, al suministrar una matriz acelular, tal como una matriz dérmica acelular. La matriz térmica acelular se procesa opcionalmente a un polvo por medio de trituración criogénica. El polvo de la matriz acelular tiene un tamaño de partículas que es menor a 2 mm. Alrededor de 1.0 gramos de polvo de matriz acelular se mezcla en 10 ml de una solución acuosa, tal como agua o tampón fosfato salino (PBS – phosphate buffered saline) para formar una mezcla matricial acelular. La matriz acelular está presente comúnmente en un monto de un 2% a 30% por masa, y preferiblemente a entre el 5% y el 20% de la masa de la solución acuosa. En otra sección, la matriz acelular se presenta en un monto de alrededor del 10% de la masa de la solución acuosa. La mezcla matricial acelular se incuba entonces a una temperatura y durante un tiempo suficientemente efectivos de 70 °C a 100 °C durante un lapso de tiempo que puede variar entre 10 minutos y 48 horas, y preferiblemente entre 80 °C y 90 °C, y típicamente durante un lapso de tiempo que puede variar entre 1 hora a 5 horas. Se permite que baje la temperatura del pegamento matricial acelular a aproximadamente 37° C para su uso inmediato o se permite que baje la temperatura hasta que esté lista para usarse.

50 En otra sección, un monto suficientemente efectivo de un plastificante tal como, la glicerina puede añadirse opcionalmente para incrementar la flexibilidad y para humedecer apropiadamente al pegamento. El plastificante puede añadirse en un monto que se basa en la naturaleza del plastificante. En el caso de la glicerina, el monto añadido al pegamento matricial acelular varía típicamente entre el 0.5% y el 10% de la masa del pegamento acuoso. El plastificante puede ser añadido y mezclado uniformemente en el pegamento acuoso antes o después de permitir

que el pegamento baje de temperatura. La glicerina se la agrega, preferiblemente, antes de permitir que el pegamento baje de temperatura para poder mezclarlo fácilmente y establecer una distribución uniforme en el pegamento.

5 La pega matricial acelular tal como se describe aquí es útil para la preparación de una matriz acelular reforzada para la reparación de tejidos y para ingeniería. La matriz acelular reforzada de este invento utiliza el pegamento matricial acelular de este invento que consiste de una capa matricial acelular, una capa de refuerzo, y una capa de pega matricial acelular. Aunque no es lo ideal, el pegamento matricial acelular de este invento también puede utilizarse como una pega o sellador de tejidos si aquellas personas expertas estuviesen dispuestos a aceptar las desventajas, que pudiesen existir.

10 La capa matricial acelular se prepara a partir de una matriz acelular. La matriz acelular se prepara tejidos que provienen de órganos o partes aisladas de órganos. Los tejidos incluyen, pero no se limitan a, válvulas de corazón, sub - mucosas intestinales pequeñas, dermis, membranas amnióticas, vejigas, omentos, pericardios, ligamentos, vasos sanguíneos y similares. En una sección, el tejido incluye, pero no se limita al omento y a la dermis. En otra sección, el tejido es la dermis. El tejido puede obtenerse de varias fuentes mamíferas incluyendo, pero sin limitarse a, fuentes humanas, de cabras, porcinas, bovinas, ovinas, equinas y similares. Tal como se describió anteriormente, el tejido es descelularizado usando procesos y técnicas convencionales para elaborar la matriz acelular. La capa matricial acelular se obtiene al dividir a la matriz acelular en láminas delgadas que tienen el grosor, comúnmente, de alrededor de 50 micrones a alrededor de 200 micrones. La matriz acelular se divide con técnicas convencionales tales como, el uso de un separador de piel de vaca.

15 La capa de refuerzo es preferiblemente un textil o algo similar o un material equivalente incluyendo, pero sin limitarse a, estructuras tejidas, entrelazadas, unidas, combadas, entretejidas (es decir, similar a nudos), no tejidas y trenzadas. Aunque no es lo ideal, la capa de refuerzo puede ser una lámina de material que no sea textil, tal como una lámina polimerasa. En una sección, la capa de refuerzo es un textil tejido, tal como una malla. En los textiles y materiales que se acaban de mencionar, las propiedades mecánicas pueden ajustarse al cambiar la densidad o textura del textil o del material. Las fibras utilizadas para hacer los textiles pueden ser, por ejemplo, monofilamentos, hilos, hebras, trenzas, o fajos de fibras. Los materiales tales como las láminas polimerasas puedan tener huecos hechos o perforados, y que puedan opcionalmente ser porosas. Las fibras y materiales tales como láminas pueden ser hechos para que sean materiales bio - compatibles, bioabsorbibles, incluyendo, pero sin limitarse a, el ácido poliláctico (PLA - polylactic acid) (incluyendo la poliáctida), ácido poliglicólico (PGA - polyglycolic acid) (incluyendo poliglicólida), policaprolactona (PCL), polidioxanona (PDO), y carbonato de trimetileno (PTMC - polytrimethylene carbonate). Las fibras también pueden ser hechas de polímeros bio - compatibles, no absorbibles incluyendo pero sin limitarse a poliolefinas, policarbonatos, polivinil cloridos, estirenos, incluyendo acrilonitrilo butadieno estireno, nylones, acrílicos, uretanos plásticos, elastómeros termoplásticos, plásticos termo estables, poliámidas, poliésteres, silicones moldeables, tereftalato de polietileno, alcohol polivinílico (PVA - polyvinyl alcohol), y co - polímeros o sus mezclas. Poliolefinas apropiadas incluyen pero no se limitan a polietileno, polipropileno, y sus co - polímeros. En una sección, las fibras que conforman el textil se forman de polipropileno.

20 En una sección, la matriz reforzada acelular se prepara al suministrar una capa de refuerzo, una capa matricial acelular, y un pegamento matricial acelular. El pegamento matricial acelular debe calentarse a una temperatura suficientemente efectiva para desnaturalizar los componentes del colágeno de la matriz acelular, comúnmente alrededor de 50° en C a 90° C y permitir entonces que se enfríe a una temperatura adecuada, típicamente alrededor de 30°C a 50° C, preferiblemente a alrededor de 37 °C antes de su uso. El pegamento matricial acelular se dispone entonces en un monto suficiente entre la capa matricial acelular y la capa de refuerzo para adherir efectivamente las capas matriciales y la capa de refuerzo y permitir que se seque en una forma convencional para formar la matriz acelular reforzada. Por ejemplo, la matriz puede ser hecha al suministrar una capa de refuerzo que tiene un lado superior y uno inferior, colocando una capa de pegamento matricial acelular en el lado superior de la capa de refuerzo, y después colocando la matriz acelular en la capa de pegamento, uniendo de esa forma la capa de refuerzo y la capa matricial acelular. Alternamente, se puede hacer la matriz al suministrar la capa matricial acelular, colocando una capa de pegamento matricial acelular en la capa matricial acelular, y entonces colocando la capa de refuerzo en la capa de pegamento, uniendo de esa forma la capa de refuerzo y la capa matricial acelular. También se puede crear una matriz acelular reforzada de varias capas al continuar alternando la capa de refuerzo, la capa de pegamento de la matriz acelular y la capa matricial acelular o variando las posiciones de los materiales en las capas de la estructura. La pega matricial acelular y la capa matricial acelular pueden prepararse del mismo tipo de tejido o de diferentes tipos de tejidos tal como se describió anteriormente. En una sección, la capa matricial acelular y la capa de pegamento matricial acelular son del mismo tipo de tejido.

25 Opcionalmente, la matriz acelular reforzada puede estabilizarse al vincular la capa de pegamento matricial acelular y la capa matricial acelular usando métodos convencionales, tales como el uso de vapor formaldehído, glutaraldehído, clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) o polisacáridos oxidados. Los polisacáridos incluyen, pero no se limitan a, ácido hialurónico, sulfato de condroitina, dermatán sulfato, queratán sulfato, heparán, sulfato de heparán, dextrano, sulfato de dextrano, alginato, y otros polisacáridos de cadena larga. En una sección, la matriz acelular reforzada se estabiliza mediante una vinculación EDC, que incluye un 1% EDC en una solución que

contiene alcohol, tal como etanol, isopropanol, propanol, preferiblemente en una concentración que puede variar entre aproximadamente 40% al 70%.

5 En una sección, uno o más agentes de activos pueden incorporarse opcionalmente de dentro y/o aplicarse a la matriz acelular reforzada. En una sección, el agente bioactivo se incorpora dentro, o se cubre en, el componente de refuerzo. En otra sección, el agente bioactivo se incorpora dentro del pegamento matricial acelular. En otra sección, el agente bioactivo se incorpora a la matriz acelular.

10 Los bioactivos incluyen, pero no se limitan a, agentes que previenen infecciones (por ejemplo, agentes antimicrobianos y antibióticos), agentes que reducen la inflamación (por ejemplo, agentes anti - inflamatorios), agentes que previenen o minimizan la adherencia de formaciones, tales como la celulosa regenerada oxidada (por ejemplo, INTERCEED y SURGICEL, disponibles de Ethicon, Inc.) y ácido hialurónico, y agentes que suprimen el sistema inmunológico (por ejemplo, inmunosupresores), factores de crecimiento heterólogos o autólogos, proteínas (incluyendo proteínas matriciales), péptidos, anticuerpos, enzimas, plaquetas, plasma rica en plaquetas, glicoproteínas, hormonas, citoquinas, glicosaminoglicanos, ácidos nucleicos, analgésicos, virus, partículas de virus, y tipos de células, agentes quimiotácticos, antibióticos, y analgésicos esteroideos y no esteroideos.

20 Un tejido viable también puede ser incluido en la matriz acelular reforzada de este invento. La fuente puede variar y el tejido puede tener varias configuraciones, sin embargo, en una sección el tejido se forma opcionalmente como un tejido desmenuzado o dividido finamente en fragmentos o pedazos, lo cual podría mejorar la efectividad de nuevo crecimiento del tejido y estimular una respuesta de saneamiento, por ejemplo, cartílago. En otra sección, el tejido viable puede estar opcionalmente en la forma de una rebanada o una tira cultivada de tejido saludable que contiene células viables capaces de regenerar y / o remodelar tejidos.

25 La matriz acelular reforzada también puede contener células viables incorporadas. Los tipos de células apropiados incluyen, pero no se limitan a, osteocitos, osteoblastos, osteoclastos, fibroblastos, células madre, células pluripotentes, progenitores de condrocitos, condrocitos, células endoteliales, macrófagos, leucocitos, adipocitos, monocitos, células plasmáticas, mastocitos, células del cordón umbilical, células estromales, células madre mesenquimales, células epiteliales, mioblastos, tenocitos, fibroblastos de ligamento, neuronas, células de médula ósea, sinoviocitos, las células madre embrionarias; células precursoras derivadas del tejido adiposo; células progenitoras sanguíneas periféricas; células madre aisladas de tejido adulto; células transformadas genéticamente; una combinación de los condrocitos y otras células; una combinación de osteocitos y otras células; una combinación de sinoviocitos y otras células; una combinación de células de médula ósea y otras células; una combinación de células mesénquimas y otras células; una combinación de células del estromales y otras células; una combinación de células madre y otras células; una combinación de células madre embrionarias y otras células; una combinación de células precursoras aisladas de tejidos adultos y de otro tipo de células: una combinación de células progenitoras periféricas de la sangre y otro tipo de células; una combinación de células madre aisladas de tejidos adultos y otros tipos de células; y una combinación de células transformadas genéticamente y otros tipos de células.

40 La matriz acelular reforzada también pueden utilizarse en técnicas de terapia genética en las cuales los ácidos nucleicos, virus o partículas de virus entregan un gen de interés, que codifica por lo menos un producto genético de interés, a células específicas o a tipos de células. De esa forma, el agente bioactivo puede ser un ácido nucleico (por ejemplo, ADN, ARN, o un oligonucleótido), un virus o una partícula de virus o un vector no viral. Los virus y las partículas de virus pueden ser el ADN o el ARN del virus o partículas derivadas de estos. El producto genético de interés se selecciona preferiblemente de un grupo que consiste de proteínas, polipéptidos, interferencia de ácidos ribonucleicos (iARN) y sus combinaciones.

50 Una vez que un monto suficientemente efectivo de los ácidos nucleicos aplicables y / o agentes virales (es decir, virus o partículas virales) se incorporan a la matriz acelular reforzada el dispositivo puede implantarse entonces a un lugar específico para provocar un tipo deseado de respuesta biológica. El ácido nucleico o el agente viral pueden entonces ser tomados por las células, y cualquier proteína que éstas codifiquen puede producirse localmente por las células. En una sección, el ácido nucleico o el agente viral pueden ser tomados por las células dentro del fragmento de tejido de la suspensión de tejido desmenuzado, o, en otra sección, el ácido nucleico o el agente viral pueden ser tomados por las células en los alrededores del lugar del tejido lastimado. Un técnico con experiencia en la industria reconocerá que la proteína producida puede ser del tipo que se acaba de describir, o una proteína similar que facilita la capacidad del tejido para sanar una lesión o una enfermedad o para combatir una infección, o reducir una respuesta inflamatoria. Los ácidos nucleicos también pueden ser utilizados para bloquear la expresión de un producto genético no deseado que puede afectar negativamente al proceso de reparación del tejido u otros procesos biológicos normales. El ADN, ARN y los agentes virales son usados convencionalmente para lograr una función de bloqueo de la expresión, que se conoce en la industria como noqueo de la expresión genética.

60 Un técnico con experiencia en la industria apreciará que la identidad del agente bioactivo puede determinarse por un cirujano, un profesional de la salud, u otro profesional de las ciencias de la vida, basándose en principios de la ciencia médica y los objetivos aplicables del tratamiento. También se entiende, que el agente bioactivo pueden incorporarse dentro de la matriz acelular reforzada antes, durante, o después de la fabricación, o antes, durante, o después de la colocación quirúrgica de la matriz acelular reforzada.

5 Las matrices a celulares reforzadas pueden ser utilizadas en los siguientes procedimientos quirúrgicos donde el refuerzo de tejidos es deseado, incluyen, pero no se limitan a, a cirugía abdominal, tal como la reparación de hernias y la reparación del piso pélvico; cirugía plástica, tal como el levantamiento de senos y el levantamiento facial, y otro tipo de cirugía de reparación, tal como la reparación de mangos rotatorios. Las matrices acelulares se montan en el tejido usando dispositivos de adherencia de tejidos convencionales incluyendo pegamentos, suturas, grapas, clavos y similares.

10 Los siguientes ejemplos ilustran los principios y prácticas de este invento, pero no se limitan a estos. Muchas secciones adicionales se volverán evidentes para aquellas personas con experiencia en la industria una vez que tengan el beneficio de la presentación.

### **EJEMPLO 1**

#### **15 Proceso para Formular el Pegamento Matricial Acelular**

20 Una matriz dérmica porcina acelular vendida bajo la marca DermMatrix (de Advanced UroScience, St. Paul, Minn.) se trituró a polvo fino usando un triturador de congelamiento 6800 (SPEX CertiPrep, Metuchen, NJ) 1.0 gramos del polvo matricial dérmicos acelular fue añadido a 10 ml de solución acuosa que contenía 7% de glicerina y 1.3 % de ácido acético en un tubo de polipropileno. El tubo fue expuesto a un baño de agua de 80° C con un movedor magnético. Después de tres horas de incubación a 80° C el pegamento se volvió opaco. La pega se removió del baño de agua y se permitió que se enfríe hasta 37° C antes de utilizarse. El proceso se ilustra en la figura 1.

### **EJEMPLO 2**

#### **25 La Preparación de Capas Delgadas de la Matriz Dérmica Porcina Acelular**

30 Una matriz dérmica porcina acelular vendida bajo la marca DermMatrix (de Advanced UroScience, St. Paul, Minn.) fue dividida en capas delgadas utilizando una máquina divisora de cuero (esto se realizó por Columbia Organ Leather, Columbia, PA) para la formulación del prototipo. La matriz dérmica porcina acelular se empapó en IPA durante 24 horas antes de dividirse. Se suministró una matriz dérmica porcina acelular de un cuadrado de 8 cm x 8 cm a la máquina divisoria y se hizo la división a un grosor final que variaba desde 0.19 milímetros a 0.10 mm. Después de la división, las láminas matriciales dérmicas porcinas acelulares fueron almacenadas en IPA para más preparamiento hasta que estuviesen listas para ser utilizadas. Este proceso se repitió para todas las muestras de matrices dérmicas porcinas acelulares.

### **EJEMPLO 3**

#### **40 Preparación de una Matriz Dérmica Porcina Acelular Reforzada**

45 El proceso para preparar una matriz dérmica acelular reforzada con una malla se muestra en la figura 1. Las muestras divididas de matrices dérmicas acelulares preparadas en el ejemplo 2 fueron lavadas con agua desionizada y después liofilizadas a 20° C. Una malla de polipropileno de masa ligera que se preparó al incubar la malla Ultrapro (Ethicon Inc. Somerville, NJ) en agua desionizada a 50 °C durante 10 días para remover su componente absorbible. La malla ligera de polipropileno fue ubicada entre 2 capas de matriciales dérmicas acelulares divididas de 3 x 5 centímetros y se pegaron juntas con 3 ml de pegamento matricial acelular preparado en el ejemplo 1 que se mantuvo a 37° C. Toda la estructura se enfrió a la temperatura del cuarto y el aire seco de la cobertura del cultivo celular.

### **EJEMPLO 4**

#### **50 Estabilización de la Matriz Dérmica Porcina Acelular Reforzada en una Malla**

55 Una matriz dérmica acelular reforzada que se preparó como se describió en el ejemplo 3 fue lavada con 100 ml de solución de tampón fosfato salino etanólico (PBS - phosphate buffered saline) (40% de etanol) durante 30 minutos. La matriz dérmica acelular reforzada que fue lavada y se transfirió entonces a 50 ml de 10 mg/mililitro de clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) en (recién preparado) PBS etanólico. Después de una incubación de 8 horas a la temperatura del cuarto, la matriz acelular reforzada vinculada se lavó dos veces con 6% de glicerina (masa / masa) en agua. Luego se secó con el aire a la matriz acelular reforzada vinculada.

### **EJEMPLO 5**

#### **60 Evaluación de la Matriz Dérmica Acelular Reforzada con Malla por SEM**

65 Las muestras preparadas en el ejemplo 4 se colocaron en un soporte de microscopio y se cubrieron con una capa delgada de oro usando el revestidor de bombardeo iónico EMS 550 (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA). El

análisis SEM se realizó utilizando el JEOL JSM-5900LV SEM (JEOL, Tokio, Japón). Las superficies y las áreas transversales fueron examinadas en cada muestra. Las imágenes SEM (refiérase a la figura 2) mostraron que la malla estaba adherida al centro de dos capas delgadas de matrices dérmicas acelulares.

5 **EJEMPLO 6**

**Modelo Animal de Reparación de Hernia**

10 Utilizando un modelo porcino, los sujetos fueron anestesiados y preparados para la cirugía en una forma convencional. Se hicieron incisiones centrales superiores / craneales y / o inferiores / caudales al ombligo: se hizo una incisión en la línea central ventral a través de la piel y del tejido subcutáneo para exponer la fascia de la pared abdominal en la línea central / línea alba. Se hicieron dos defectos meridianos uno craneal y otro caudal al ombligo de aproximadamente 3 cm de largo en la línea alba exponiendo el tejido graso pre - peritoneal y el peritoneo. La matriz acelular reforzada con malla se cortó a un tamaño apropiado, se colocó en forma plana en la fascia abdominal fijándola con suturas PROLENE con suturas de tamaño #3-0 (Ethicon, Inc., Sommerville, NY). El tejido subcutáneo y la piel se cerraron con suturas Monocryl de tamaño USP 3-0. Adicionalmente, la piel se pegó con un adhesivo tópico de piel para prevenir una contaminación temprana de la herida.

20 **EJEMPLO 7**

**Reparación de Hernias Humanas Abiertas con Matrices Acelulares Reforzadas**

25 Se preparó a un paciente humano en una forma convencional para el procedimiento de reparación de una hernia abierta. Se suministró Anestesia General en una forma convencional, opcionalmente, el paciente puede haber sido expuesto a anestesia convencional local o regional, dependiendo de la ubicación de la hernia y de la complejidad de la reparación. Un catéter se puede insertar opcionalmente a la vejiga para remover la orina y descomprimir la vejiga.

30 Se realiza una incisión con el tamaño suficiente para remover la grasa y marcar el tejido de la pared abdominal cerca de la hernia. Los filos exteriores del área debilitada de la hernia se definen y el tejido que estaba en exceso se remueve del área. Entonces se aplica la matriz acelular reforzada de este invento para que cubra el área debilitada por varias pulgadas o centímetros en todas las direcciones y se fije en ese lugar con suturas no absorbibles. Entonces la pared abdominal se aproxima y se cierra con suturas no absorbibles. Las suturas se amarran y se aseguran.

35 En comparación con los métodos convencionales para combinar estructuras sintéticas con una matriz acelular, las estructuras sintéticas y la matriz acelular de la presentación de este invento se han integrado bien para evitar delaminación. Como resultado, la estructura es flexible. El pegamento matricial acelular suministra un medio de entrega para incorporar bioactivos en las estructuras compuestas.

40

45

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

- 5
1. Un método para hacer un pegamento matricial acelular que incluye los pasos de:
- suministrar una matriz acelular; añadir la matriz acelular a una solución acuosa para suministrar una mezcla; e incubar la mezcla durante un tiempo que varía entre 10 minutos a 48 horas a una temperatura que varía entre 70° C a 100° C para formar una pega matricial acelular.
- 10
2. El método de la reivindicación 1, que incluye el paso adicional de permite elaborar el pegamento matricial acelular enfriarse a 37°C antes de su uso.
- 15
3. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la matriz acelular incluye tejido descelularizado obtenido de una fuente mamífera seleccionada de un grupo que podría incluir una fuente humana, de cabra, porcina, bovina, ovina y equina.
- 20
4. El método de la reivindicación 3, donde el tejido descelularizado se selecciona de un grupo que incluye a válvulas del corazón, submucosas intestinales pequeñas, dermis, membranas amnióticas, vejigas, omentos, pericardios, ligamentos y vasos sanguíneos.
- 25
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la solución acuosa se selecciona de un grupo que incluye agua, amortiguadores fisiológicos y soluciones salinas.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el pegamento matricial acelular también incluye un plastificante seleccionado de un grupo que incluye glicerina, propilenglicol, y polietilenglicol.
- 30
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el pegamento matricial acelular incluye un 2% (masa / volumen) de matriz acelular y un 30% (masa / volumen) de solución acuosa.
- 35
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la matriz acelular se añade a la solución acuosa en un monto que varía desde el 2% al 30% de la masa de la solución acuosa.
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

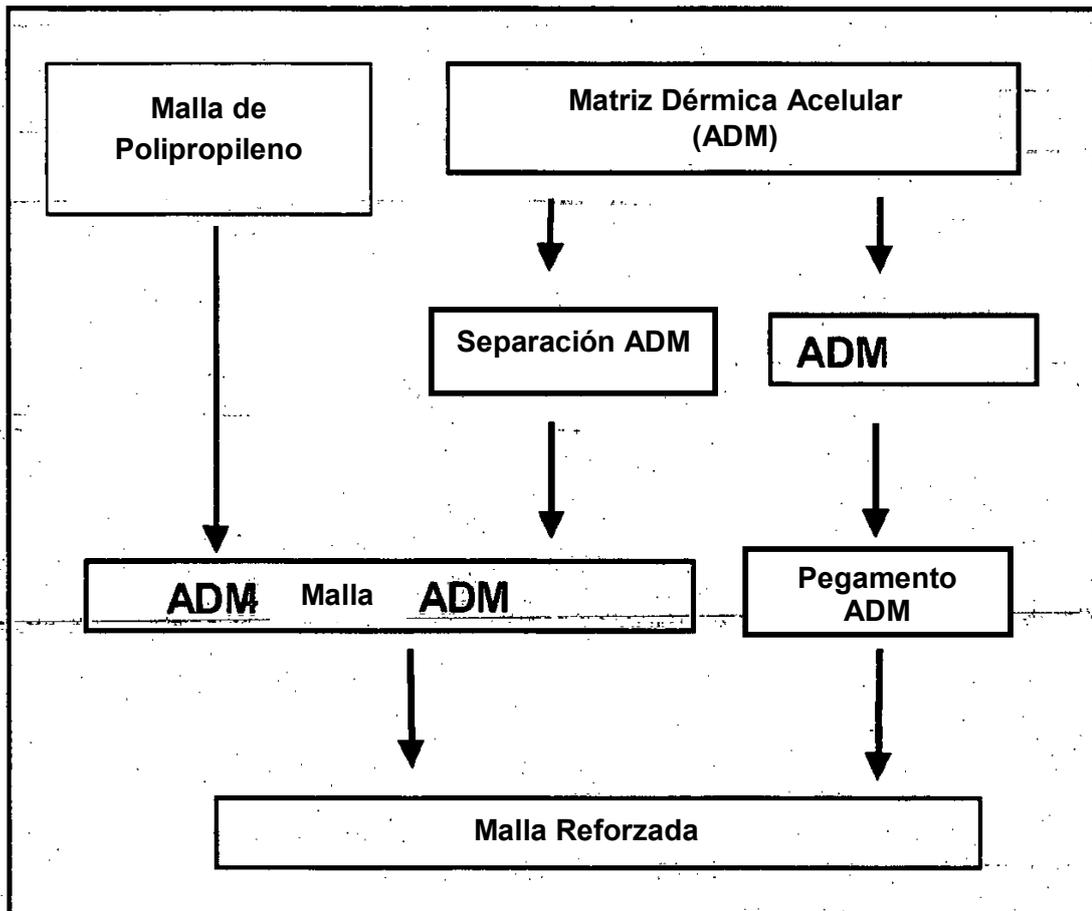


FIG. 1

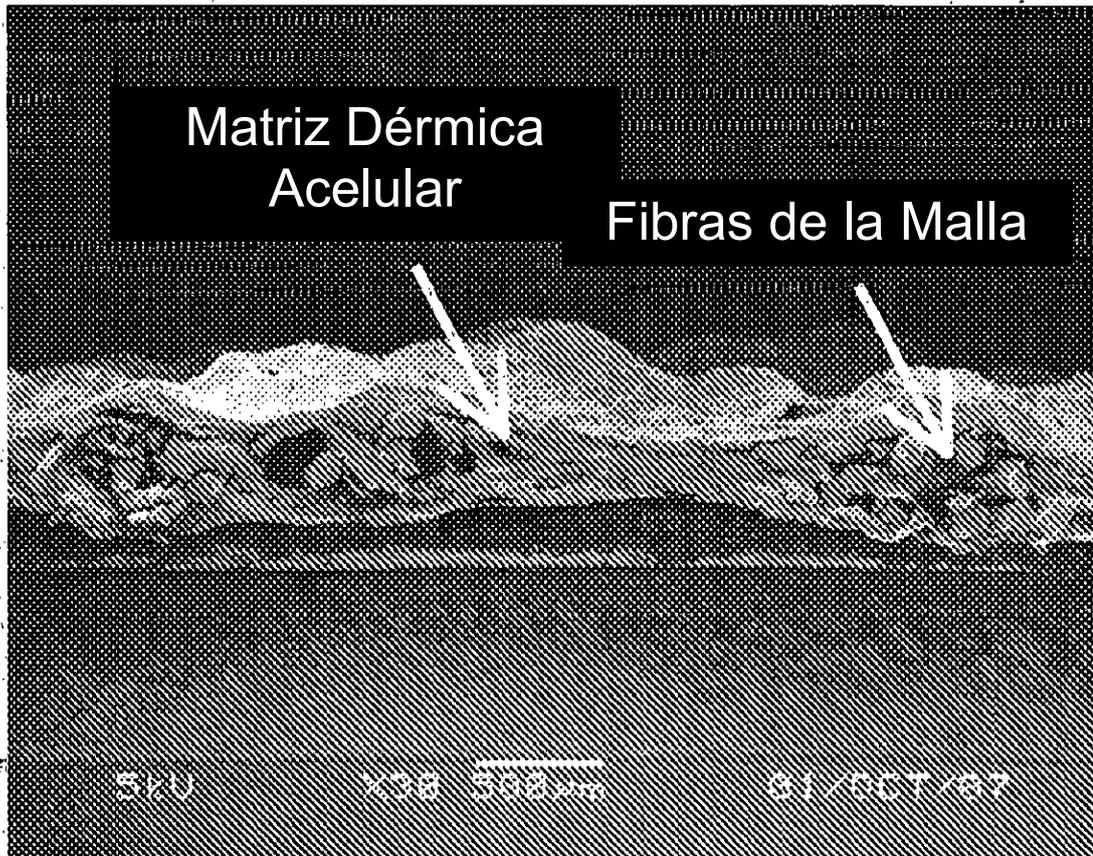


FIG. 2