

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 293**

51 Int. Cl.:

<b>A61L 27/36</b>	(2006.01)
<b>A61L 15/40</b>	(2006.01)
<b>A61L 17/08</b>	(2006.01)
<b>A61L 26/00</b>	(2006.01)
<b>A61L 31/00</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.10.2010 PCT/IB2010/002528**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.04.2011 WO11042794**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2010 E 10768065 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018 EP 2485779**

54 Título: **Material de soporte para el cuidado de heridas y/u otras aplicaciones de curación de tejidos**

30 Prioridad:

**07.10.2009 US 249341 P**  
**10.06.2010 US 353320 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**19.04.2018**

73 Titular/es:

**KERECIS EHF (100.0%)**  
**Borgartun 28**  
**105 Reykjavik, IS**

72 Inventor/es:

**SIGURJONSSON, GUDMUNDUR FERTRAM;**  
**GISLADOTTIR, DORA HLIN y**  
**GUDMUNDSSON, GUDMUNDUR PHD**

74 Agente/Representante:

**DURAN-CORRETJER, S.L.P**

**ES 2 664 293 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

Material de soporte para el cuidado de heridas y/u otras aplicaciones de curación de tejidos

### 5 SECTOR

La presente invención se refiere a un material de soporte para el cuidado de heridas y/u otras aplicaciones de curación de tejidos y procedimientos para la fabricación del mismo. El material de soporte comprende una matriz extracelular descelularizada de piel de pescado, según la reivindicación 1.

10

### ANTECEDENTES

Un conjunto de materiales humanos, animales y sintéticos se describen o utilizan actualmente en procedimientos médicos para aumentar, reparar o corregir defectos de tejidos.

15

Por ejemplo, la solicitud de patente publicada de Estados Unidos N.º 2003/0059460 da a conocer un material de polímero híbrido que comprende polímeros sintéticos y naturales que pueden utilizarse en la regeneración de tejido de organismos vivos. El híbrido comprende un polímero de origen natural reticulado y un polímero sintético absorbible por biodegradación. Sin embargo, deben llevarse a cabo una serie de etapas de proceso complicadas para producir el material híbrido. Además, el material híbrido resultante contiene materiales sintéticos, así como materiales de origen natural.

20

La patente de Estados Unidos N.º 6.541.023 describe la utilización de geles de colágeno porosos derivados de piel de pescado para utilizar como soportes en el diseño de tejidos. La preparación de los geles de colágeno implica la molienda de la piel de pescado. Además, la patente de China N.º 1068703 describe un procedimiento para la preparación de piel de pescado para vendar heridas de quemaduras, que implica separar la piel de pescado del cuerpo del pescado y colocar la piel en una solución de conservación de tintura de yodo, etanol, borneol, sulfadiazina de zinc y ácido clorhídrico en cantidades suficientes para establecer un valor de pH de 2,5-3. Sin embargo, estos productos pueden ser difíciles de manipular, ya que el producto de la patente de Estados Unidos N.º 6.541.023 está en forma de gel y el producto de la patente de China N.º 1068703 se almacena en una solución.

25

30

Además, se han derivado de piel humana un conjunto de productos de matriz extracelular para utilizaciones médicas (ALLODERM® Regenerative Tissue Matrix (LifeCell)); dermis bovino fetal (PRIMATRIX® Dermal Repair Scaffold (TEI Biosciences)); vejiga urinaria porcina (MATRISTEM® Extracellular Matrix Wound Sheet (Medline Industries, Inc.)); y submucosa de intestino delgado porcino (OASIS® Wound Matrix (HealthPoint Ltd.)) BAYLAK da a conocer "The extracellular matrix as a biologic scaffold material" en BIOMATERIALS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV., BARKING, GB, volumen 28, N.º 25, 5 de junio de 2007 (05-06-2007), páginas 3587-3593. Sin embargo, existe una necesidad de productos mejorados y procedimientos para mejorar la curación de heridas y la reparación de tejidos. La presente invención satisface esta necesidad.

35

40

### CARACTERÍSTICAS

La matriz extracelular (ECM) de los vertebrados es una entidad estructural compleja que rodea y soporta las células. La ECM está compuesta por mezclas complejas de proteínas estructurales, la más abundante de las cuales es el colágeno, y otras proteínas especializadas y proteoglicanos. El material de soporte descrito en el presente documento es un soporte acelular ampliamente intacto de componentes de ECM biológicos naturales de piel de pescado. El soporte comprende también lípidos de origen natural de la piel de pescado. La estructura tridimensional nativa, la composición y la función de la ECM dérmica están esencialmente inalteradas, y proporcionan un soporte para soportar la migración celular, la adhesión, la proliferación y la diferenciación, facilitando de este modo la reparación y/o sustitución de tejidos. La presente invención también se refiere a procedimientos de fabricación y de utilización del material de soporte.

45

50

### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra una muestra ilustrativa de un producto de ECM descelularizada (material de soporte) fabricado de piel de pescado según un procedimiento descrito en el presente documento.

La figura 2 muestra imágenes ópticas de secciones transversales de material de soporte a 100 aumentos (2A) y 400 aumentos (2B).

La figura 3 muestra el microscopio de barrido de electrones (SEM) de imágenes de secciones transversales de material de soporte a 300 aumentos (3A) y 600 aumentos (3B).

55

60

### DESCRIPCIÓN

Un material de soporte, según la presente invención, se obtiene a partir de piel de pescado intacta. Un ejemplo ilustrativo que muestra el aspecto de una muestra del material de soporte se muestra en la figura 1. Se puede utilizar cualquier especie de pescado, incluyendo peces óseos o cartilaginosos, como la fuente de la piel de pescado. Por

65

ejemplo, la fuente puede ser pescados redondos, tales como bacalao, eglefino y bagre; pescados planos, tales como halibut, platija y lenguado; salmónidos, tales como salmón y trucha; escombroides, tales como atún; o peces pequeños, tales como arenque, anchoa, caballa y sardina. En ciertas realizaciones, la piel de pescado se obtiene de pescados oleosos de agua fría y/o pescados que se sabe que contienen cantidades elevadas de aceite con omega-3. Entre los ejemplos de pescados con un contenido elevado de aceite con omega-3 están el salmón, las sardinas, el atún, el arenque, el bacalao, las sardinias jóvenes, la caballa, el pez sable, los eperlanos, el pescado blanco, el pez hoki y algunas variedades de trucha.

La piel de pescado se elimina del pescado antes del procesamiento. Si la piel de pescado es de una especie de pez que tiene escamas, la piel de pescado debe desescamarse de manera que se elimina una parte sustancial de las escamas o, como mínimo, se elimina la hidroxiapatita de las escamas. La frase "se elimina una parte sustancial de las escamas" o "sustancialmente libre de escamas" significa que se elimina, como mínimo, el 95%, de manera preferente, como mínimo, el 99% y, de manera más preferente, el 100% de las escamas de la piel de pescado. Una piel de pescado "sustancialmente libre de escamas" también puede referirse a piel de pescado de una especie de pez sin escamas. Las escamas se eliminan antes de todo el procesamiento, con presión puramente mecánica (a través, por ejemplo, de un cuchillo, agitación con abrasivos, presión de agua, un dispositivo especial de eliminación de escamas que utiliza la misma fuerza mecánica que los cuchillos u otro dispositivo de presión, como el pulido con material cerámico o plástico) o después de algún tratamiento químico (por ejemplo, descelularización) y, a continuación, con presión mecánica a efectos de eliminar las escamas por lavado. Si la piel de pescado se trata en primer lugar químicamente y/o enzimáticamente (por ejemplo, tratamiento con TRITON® X-100), la presión mecánica, en general, tiene que ser suave, ya que la piel es más vulnerable a la rotura después de la descelularización. Las escamas se pueden eliminar en más de una etapa, por ejemplo, la eliminación parcial antes de la descelularización, seguido de la eliminación adicional durante y/o después de la descelularización. Alternativamente, las escamas se pueden eliminar mediante solamente tratamiento químico.

Después de eliminar las escamas, la piel de pescado opcionalmente se congela antes de la descelularización. La piel de pescado se puede congelar rápidamente mediante la incubación de la piel en nitrógeno líquido o utilizando otro equipo especial de congelación que puede congelar la piel hasta -70°C o inferior, a efectos de conservar la estructura de colágeno del soporte. De manera alternativa, la piel de pescado se puede congelar en un tipo convencional de congelador que se encontraría habitualmente en una fábrica de pescado. El proceso de congelación puede lisar o parcialmente lisar las células que comprenden la piel de pescado intacta, y ayudar a facilitar la descelularización de la piel de pescado. Si la piel de pescado se ha congelado, posteriormente puede descongelarse para un procesamiento adicional.

Tanto si se congeló o no la piel de pescado, se puede lavar con una solución tampón antes del procesamiento adicional. Por ejemplo, la piel de pescado se puede lavar 1-3 veces con una solución tampón que contiene opcionalmente uno o más antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico (tal como, ácido ascórbico 50 mM), vitaminas A, C, E y beta caroteno), antibióticos (por ejemplo, estreptomycin y penicilina), proteasas (por ejemplo, dispasa II) e inhibidores de proteasa (por ejemplo, antipaína, aprotinina, benzamidina, bestatina, DFP, EDTA, EGTA, leupeptina, pepstatina, fosforamidón y PMSF) para facilitar la desinfección y la estabilización de la piel de pescado. La solución tampón puede estar a un pH, como mínimo, de 5,5, tal como 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0 o más. En ciertas realizaciones, el pH está entre 7,0 y 9,0, por ejemplo, entre 7,5 y 8,5. La solución tampón también se puede utilizar como un medio en el que la piel de pescado se puede almacenar durante algunos días hasta algunas semanas o más. En ciertas realizaciones, la piel de pescado se almacena en la solución tampón a una temperatura de aproximadamente 4°C.

Después de la congelación y/o lavado y/o almacenamiento en una solución tampón, la piel de pescado se trata con una o más soluciones de descelularización para eliminar el material celular, incluyendo material antigénico, de la piel de pescado con un mínimo o ningún daño a la integridad mecánica y estructural y la actividad biológica de la matriz extracelular de origen natural.

Los términos "matriz extracelular" o "ECM", tal como se utilizan en el presente documento, se refieren al material de tejido no celular presente dentro de la piel de pescado que proporciona soporte estructural a las células de la piel además de realizar otras funciones importantes. La ECM descrita en el presente documento no incluye material de matriz que se ha constituido o reformado completamente a partir de componentes de ECM extraídos, purificados o separados (por ejemplo, colágeno).

Los términos "acelular", "descelularizado", "piel de pescado descelularizado", y similares, tal como se utilizan en el presente documento, se refieren a una piel de pescado de la que se ha eliminado una cantidad sustancial de contenido celular y de ácido nucleico, dejando una estructura intersticial tridimensional compleja de ECM. "Agentes descelularizantes" son aquellos agentes que son eficaces en la eliminación de una cantidad sustancial de contenido celular y de ácido nucleico de la ECM. La ECM está "descelularizada" o está "sustancialmente libre" de contenido celular y de ácido nucleico (es decir, se ha eliminado una "cantidad sustancial") cuando, como mínimo, el 50% de los ácidos nucleicos y otro material celular viables y no viables se ha eliminado de la ECM. En ciertas realizaciones, se elimina aproximadamente el 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 100% de los ácidos nucleicos y material celular viables y no viables. La descelularización se

puede verificar, por ejemplo, mediante el análisis del contenido de ADN de la piel de pescado tratada. Se puede determinar la eliminación de los ácidos nucleicos de la ECM, por ejemplo, mediante el examen histológico de la ECM, y/o mediante un ensayo bioquímico, tal como el ensayo PICOGREEN®, ensayo de difenilamina, o mediante PCR.

5 La descelularización altera las membranas celulares y libera el contenido celular. La descelularización puede implicar uno o más tratamientos físicos, uno o más tratamientos químicos, uno o más tratamientos enzimáticos o cualquier combinación de los mismos. Entre los ejemplos de tratamientos físicos están la sonicación, la agitación mecánica, el masaje mecánico, la presión mecánica y la congelación/descongelación. Entre los ejemplos de agentes descelularizantes químicos están sales iónicas (por ejemplo, azida sódica), bases, ácidos, detergentes (por ejemplo, detergentes no iónicos e iónicos), agentes oxidantes (por ejemplo, peróxido de hidrógeno y peroxiácidos), soluciones hipotónicas, soluciones hipertónicas, agentes quelantes (por ejemplo, EDTA y EGTA), disolventes orgánicos (por ejemplo, tri(n-butil)-fosfato), ácido ascórbico, metionina, cisteína, ácido maleico y polímeros que se unen al ADN (por ejemplo, poli-L-lisina, polietilimina (PEI) y poliamidoamina (PAMAM)). Entre los detergentes no iónicos se incluyen 4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil-polietilenglicol, t-octilfenoxipolietoxietanol, polietilenglicol terc-octilfenil éter (TRITON® X-100) (Dow Chemical Co.). Entre los detergentes iónicos se incluyen dodecilsulfato de sodio (SDS), desoxicolato de sodio, TRITON® X-200 y detergentes zwitteriónicos (por ejemplo, CHAPS). Entre otros detergentes descelularizantes adecuados se incluyen monooleato de polioxietilen (20) sorbitano y monooleato de polioxietilen (80) sorbitano (Tween 20 y 80), 3-[(3-cloramidopropil)-dimetilamino]-1-propano-sulfonato, octil glucósido y dodecilsulfato de sodio. Entre los ejemplos de agentes descelularizantes enzimáticos están las proteasas, las endonucleasas y las exonucleasas. Entre las proteasas se incluyen proteasas de serina (por ejemplo, tripsina), proteasas de treonina, proteasas de cisteína, proteasas de aspartato, metaloproteasas (por ejemplo, termolisina), y proteasas de ácido glutámico. La descelularización se lleva a cabo, en general, a un pH, como mínimo, de 5,5, tal como 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0 o más. En ciertas realizaciones, el pH está entre 7,0 y 9,0, por ejemplo entre 7,5 y 8,5.

Un ejemplo de una etapa de descelularización es incubar la piel de pescado en una solución que comprende NaCl 1 M, ácido desoxicólico al 2%, azida sódica al 0,02% y 500 ppm de estreptomina. En otro ejemplo, se incuba la piel de pescado con una primera solución descelularizante que comprende una proteasa (por ejemplo, 2,5 U/ml de dispasa II) y otros componentes (por ejemplo, azida sódica al 0,02%). La primera solución descelularizante se vierte y la piel de pescado se trata, a continuación, con una segunda solución descelularizante, tal como una solución que comprende un detergente (por ejemplo, TRITON® X-100 al 0,5%) y otros componentes (por ejemplo, azida sódica al 0,02%). En otro ejemplo, la piel de pescado se trata primero con una solución descelularizante que comprende detergente (por ejemplo, TRITON® X-100 al 0,5%) con otros componentes (por ejemplo, EDTA al 0,02%, azida sódica y/o ácido desoxicólico), y a continuación se incuba en una segunda solución descelularizante que comprende un detergente, tal como SDS.

La piel de pescado puede incubarse o no bajo agitación. La etapa o etapas descelularizantes se pueden repetir según sea necesario mediante separación por vertido de cualquier solución descelularizante restante, opcionalmente el lavado de la piel de pescado con una solución tampón (por ejemplo, solución salina equilibrada de Hank) y, a continuación, el tratamiento de la piel de pescado de nuevo con otra etapa de descelularización. Una vez que se ha extraído una cantidad suficiente de material celular, se puede extraer la solución descelularizante (por ejemplo, mediante aspiración o mediante vertido suave de la solución).

Después de la descelularización, la piel de pescado puede opcionalmente lavarse con agua, solución tampón y/o solución de sal. Entre los ejemplos de soluciones de lavado adecuados se incluyen solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS), solución salina equilibrada de Hank (HBSS), Medium 199 (M199, SAFC Biosciences, Inc.) y/o L-glutamina. La etapa o etapas de lavado se llevan a cabo, en general, a un pH, como mínimo, de 5,5, tal como 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0 o más. En ciertas realizaciones, el pH está entre 7,0 y 9,0, por ejemplo entre 7,5 y 8,5.

La piel de pescado opcionalmente se puede blanquear para mejorar la apariencia del producto final. El blanqueo puede llevarse a cabo antes, después y/o simultáneamente con la descelularización. Por ejemplo, se pueden incorporar uno o más agentes de blanqueo en una o más de las soluciones de descelularización y/o en una o más soluciones tampón. Entre los ejemplos de agentes de blanqueo se incluyen sulfito de sodio, peróxido de hidrógeno, persulfato de amonio, persulfato de potasio y persulfato de sodio. En ciertas realizaciones, si se utiliza un agente de blanqueo fuerte, como persulfato o persulfatos, el blanqueo y la descelularización se pueden combinar en una sola etapa que comprende la incubación de la piel de pescado en una mezcla de uno o más agentes de blanqueo, espesantes y fuentes de peróxido. Por ejemplo, se puede preparar una mezcla seca de blanqueo (véase, por ejemplo, las "mezclas de blanqueo" descritas en el ejemplo 5), seguido de la adición de agua, peróxido de hidrógeno o una combinación de los mismos a la mezcla seca para formar una solución de blanqueo que también puede ser suficiente para la descelularización. Los agentes de blanqueo (por ejemplo, sulfito de sodio, peróxido de hidrógeno, persulfato de amonio, persulfato de potasio y persulfato de sodio) deben ser aproximadamente el 40-60% p/p de la mezcla seca. Se puede añadir una combinación de EDTA y persulfatos a la mezcla para acelerar el blanqueo, así como la descelularización. En ciertas realizaciones, la concentración de EDTA en la mezcla seca es de aproximadamente 0,25-5% p/p. El peróxido de hidrógeno puede ser aproximadamente el 15-25% de la mezcla; la

fuelle de peróxido puede ser percarbonato de sodio y percarbonato de potasio. El fosfato de sodio perhidratado y el carbonato de sodio o el metasilicato de magnesio y el silicato de silicio también se pueden utilizar como una fuente de peróxido. La mezcla seca también puede incluir sílice y sílice hidratada, por ejemplo, al 1-10% p/p, y, opcionalmente, uno o más de estearatos (por ejemplo, estearato de amonio, estearato de sodio y/o estearato de magnesio). Además, la mezcla seca puede incluir, opcionalmente, espesantes, tales como hidroxipropilmetil celulosa, hidroxietil celulosa, algina (es decir, alginato), gomas orgánicas (por ejemplo, celulosa, goma xantana), metasilicato de sodio y combinaciones de los mismos, para aumentar la viscosidad de la solución de blanqueo/descelularización y proteger las fibras de proteína de los daños. El blanqueo y/o el blanqueo más descclularización, en general, se lleva a cabo a un pH, como mínimo, de 5,5, tal como 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0 o más. En ciertas realizaciones, el pH está entre 7,0 y 9,0, por ejemplo, entre 7,5 y 8,5. Después del blanqueo y/o el blanqueo más descclularización, la piel de pescado se lava, opcionalmente, con una solución que comprende L-glutamina en las condiciones de pH descritas anteriormente.

En ciertas realizaciones, la piel de pescado se trata con una enzima de digestión. De manera similar al blanqueo, la digestión puede llevarse a cabo antes, después y/o simultáneamente con la descclularización. Entre las enzimas adecuadas se incluyen proteasas, por ejemplo, proteasas de serina, proteasas de treonina, proteasas de cisteína, proteasas de aspartato, metaloproteasas y proteasas de ácido glutámico. En ciertas realizaciones, la enzima de digestión es una proteasa de serina, tal como tripsina. La enzima de digestión puede ser una enzima que funciona en un medio alcalino, limita la reticulación dentro de la ECM y ablanda la piel de pescado. La digestión se lleva a cabo, en general, a un pH, como mínimo, de 5,5, tal como 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0 o más. En ciertas realizaciones, el pH está entre 7,0 y 9,0, por ejemplo, entre 7,5 y 8,5.

La piel de pescado descclularizada, opcionalmente, puede criopreservarse. La criopreservación puede implicar sumergir la piel de pescado en una solución crioprotectora antes de la congelación. La solución crioprotectora comprende, en general, un tampón apropiado, uno o más crioprotectores y, opcionalmente, un disolvente, por ejemplo, un disolvente orgánico que en combinación con agua se somete a expansión y contracción mínimas. Entre los ejemplos de crioprotectores se incluyen sacarosa, rafinosa, dextrano, trehalosa, dimetilacetamida, dimetilsulfóxido, etilenglicol, glicerol, propilenglicol, 2-metil-2,4-pantandial, ciertas proteínas y péptidos anticongelantes, y combinaciones de los mismos. Alternativamente, si la piel de pescado descclularizada se congela rápidamente (congelación súbita) antes de la sublimación a efectos de minimizar los cristales de hielo formados durante la etapa de congelación, las pieles, opcionalmente, se pueden congelar en una solución tampón que no incluye crioprotectores. La criopreservación se realiza, en general, a un pH, como mínimo, de 5,5, tal como 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0 o más. En ciertas realizaciones, el pH está entre 7,0 y 9,0, por ejemplo, entre 7,5 y 8,5.

La piel de pescado descclularizada puede envasarse dentro de un recipiente estéril, tal como un vial de vidrio o una bolsa. En una realización, se utiliza una bolsa TYVEK®. Por ejemplo, la piel de pescado se puede incubar en una solución crioprotectora, se envasa en una bolsa TYVEK® y, a continuación, se coloca en un liofilizador y se congela a una velocidad que es compatible con el crioprotector.

La piel de pescado descclularizada se puede liofilizar, es decir, congelar a baja temperatura y en condiciones de vacío, de manera que el agua se elimina secuencialmente de cada fase de cristal de hielo sin recristalización del hielo. Durante la liofilización, el agua se elimina, en general, primero a través de sublimación y, a continuación, a través de desorción, si es necesario. Otro procedimiento de eliminación del exceso de agua después del procesado y antes de la esterilización es el prensado al vacío.

En ciertas realizaciones, la piel de pescado descclularizada se esteriliza antes y/o después de congelarse. Los procedimientos de esterilización son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la piel de pescado descclularizada se puede colocar en una cámara de óxido de etileno y se trata con ciclos adecuados de óxido de etileno. Entre otros procedimientos de esterilización se incluyen la esterilización con ozono, dióxido de carbono, formaldehído gaseoso o radiación (por ejemplo, radiación gamma, rayos X, procesamiento con haz de electrones y partículas subatómicas).

Como alternativa o además de la congelación, la piel de pescado descclularizada puede conservarse en una solución no acuosa, tal como alcohol. Además de la liofilización o prensado al vacío, la piel de pescado descclularizada puede conservarse en una solución no acuosa, tal como alcohol.

El producto resultante (material de soporte) es una matriz estéril a base de colágeno que posee propiedades que pueden facilitar la regeneración, reparación y/o sustitución de tejido (por ejemplo, reparación, regeneración y/o crecimiento de tejido endógeno). El término "material de soporte" se refiere a un material que comprende piel de pescado que ha sido descclularizado, tal como en la reivindicación 1 y, opcionalmente, blanqueado, digerido, etc., tal como se describió anteriormente. El material de soporte puede proporcionar un soporte intacto para soportar células endoteliales y/o células epiteliales, puede ser integrado por el huésped, es biocompatible, no se calcifica significativamente y se puede almacenar y transportar a temperatura ambiente. La frase "integrado por el huésped" significa en el presente documento que las células y los tejidos del paciente a tratar con el material de soporte pueden crecer en el material de soporte y que el material de soporte está en realidad integrado/absorbido en el cuerpo del paciente. El término "biocompatible" se refiere a un material que es sustancialmente no tóxico en el medio

*in vivo* de su uso pretendido, y que no es rechazado sustancialmente por el sistema fisiológico del paciente (es decir, es no antigénico). Esto se puede medir por la capacidad de un material para pasar las pruebas de biocompatibilidad expuestas en la norma N.º 10993 de la Organización Internacional de Normalización (ISO) y/o la Farmacopea de Estados Unidos (USP) 23 y/o el memorándum del libro azul de la Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos (FDA) N.º G95-1, titulado "Use of International Standard ISO-10993, Biological Evaluation of Medical Devices Part 1: Evaluation and Testing". Habitualmente, estas pruebas miden la toxicidad de un material, la infectividad, la pirogenicidad, el potencial de irritación, la reactividad, la actividad hemolítica, la carcinogenicidad y/o la inmunogenicidad. Una estructura o material biocompatible, cuando se introduce en la mayoría de pacientes, no causará una reacción o respuesta biológica significativamente adversa, de larga duración o escalada, y se distingue de una inflamación leve y transitoria que acompaña típicamente a la cirugía o implantación de objetos extraños en un organismo vivo.

Los niveles persistentemente elevados de metaloproteasas de matriz (MMP) pueden contribuir a la cronicidad de la herida. El material de soporte descrito en el presente documento puede absorber metaloproteasas de matriz (MMP), promoviendo así la curación de heridas y la transición de una herida crónica a una herida aguda.

El material de soporte contiene proteínas de la matriz extracelular (ECM) de la piel de pescado. Entre los componentes de la ECM en el material de soporte se pueden incluir, por ejemplo, proteínas estructurales; glicoproteínas adhesivas; proteoglicanos; polisacáridos no proteoglicanos; y proteínas matricelulares. Entre los ejemplos de proteínas estructurales se incluyen colágenos (la proteína más abundante en la ECM), tales como los colágenos fibrilares (tipos I, II, III, V y XI); colágenos facit (tipos IX, XII y XIV), colágenos de cadena corta (tipos VIII y X), colágeno de la membrana basal (tipo IV), y otros colágenos (tipos VI, VII y XIII); elastina; y laminina. Entre los ejemplos de glicoproteínas adhesivas se incluyen fibronectina; tenascinas; y trombospondina. Entre los ejemplos de proteoglicanos se incluyen sulfato de heparina; sulfato de condroitina; y sulfato de queratano. Un ejemplo de un polisacárido no proteoglicano es el ácido hialurónico. Las proteínas matricelulares son un grupo estructuralmente diverso de proteínas extracelulares que regulan la función celular a través de interacciones con receptores de la superficie celular, citoquinas, factores de crecimiento, proteasas y la ECM. Entre los ejemplos se incluyen trombospondinas (TSP) 1 y 2; tenascinas; y SPARC (proteína secretada, ácida y rica en cisteína). La descelerización (y otras etapas de procesamiento opcionales) no eliminan todos los lípidos de origen natural de la capa lipídica de la piel de pescado. De este modo, el material de soporte comprende uno o más lípidos de la piel de pescado, en particular, de la capa lipídica de la piel de pescado. Por ejemplo, el material de soporte puede incluir hasta aproximadamente el 25% p/p de lípidos (de peso en seco del material de soporte total después de la liofilización), tal como 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6% 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, o 24% p/p de lípidos. La presencia de lípidos en el material de soporte se puede verificar, por ejemplo, mediante extracción con disolvente orgánico, seguido de cromatografía. Entre los ejemplos de disolventes orgánicos adecuados se incluyen acetona y cloroformo.

Los lípidos en el material de soporte pueden incluir, por ejemplo, acilos grasos (es decir, ácidos grasos, sus conjugados y derivados; glicerolípidos; glicerofosfolípidos (es decir, fosfolípidos); esfingolípidos; sacarolípidos; policétidos; lípidos de esteroles (es decir, esteroides); ciertas vitaminas solubles en grasas; lípidos prenoles y/o policétidos. Entre los ejemplos de acilos grasos se incluyen ácidos grasos saturados, tales como ácidos grasos poliinsaturados; ésteres grasos; amidas grasas; y eicosanoides. En ciertas realizaciones, entre los ácidos grasos se incluyen ácidos grasos omega-3, tales como ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) (que se encuentran en alta concentración en el aceite de pescado). Entre otros ácidos grasos encontrados en el aceite de pescado se incluyen ácido araquídico, ácido gadoleico, ácido araquidónico, ácido butírico, ácido caproico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido palmitoleico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido vaccénico, ácido linoleico, ácido alfa-linolénico, ácido gamma-linolénico, ácido behénico, ácido erúxico y ácido lignocérico. Entre los ejemplos de glicerolípidos se incluyen gliceroles monosustituidos, disustituidos y trisustituidos, tales como monoacilgliceroles, diacilgliceroles y triacilgliceroles (es decir, monoglicéridos, diglicéridos, y triglicéridos). Entre los ejemplos de glicerofosfolípidos se incluyen fosfatidilcolina; fosfatidiletanolamina; y fosfatidilserina. Entre los ejemplos de esfingolípidos se incluyen fosfoesfingolípidos y glicoesfingolípidos. Entre los ejemplos de lípidos de esteroles se incluyen colesterol; esteroides; y secoesteroides (diversas formas de vitamina D). Entre los ejemplos de lípidos prenoles se incluyen isoprenoides; carotenoides; y quinonas e hidroquinonas, tales como vitaminas E y K.

El material de soporte puede contener uno o más agentes activos adicionales (es decir, un agente que se añade durante o después del procesamiento del material de soporte), tales como antibióticos, antisépticos, agentes antimicrobianos, antivirales, antifúngicos, antiparasitarios y agentes antiinflamatorios. El principio activo puede ser un compuesto o composición que facilita el cuidado de heridas y/o curación de tejidos, tal como un antioxidante o fármaco. También puede ser una proteína o proteínas y/u otros productos biológicos. Se pueden añadir antibióticos, antisépticos y agentes antimicrobianos en una cantidad suficiente para proporcionar propiedades antimicrobianas eficaces al material de soporte. En ciertas realizaciones, el agente antimicrobiano es uno o más metales antimicrobianos, tales como plata, oro, platino, cobre, zinc, o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, la plata puede añadirse al material de soporte durante el procesamiento en forma iónica, metálica, elemental y/o coloidal. La plata puede estar también combinada con otros agentes antimicrobianos. Los agentes antiinflamatorios se pueden añadir en una cantidad suficiente para reducir y/o inhibir la inflamación en el área de la herida o tejido donde se

aplica el material de soporte.

5 El material de soporte se puede utilizar en forma seca. Alternativamente, el material de soporte puede rehidratarse antes de su utilización. En ciertas realizaciones, uno o más materiales de soporte están laminados juntos para formar un material de soporte más grueso.

10 En general, el material de soporte tiene de aproximadamente 0,1 a 4,0 mm de grosor (es decir, en la sección transversal), tal como 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0 o 3,5 mm de grosor. El grosor puede depender de un conjunto de factores, incluyendo la especie de pescado utilizada como material de partida, el procesamiento, la liofilización y/o la rehidratación (véase el ejemplo 14). Por supuesto, el grosor es proporcionalmente mayor cuando el producto comprende más de una capa de material de soporte.

15 El material de soporte descrito en el presente documento se puede utilizar para una variedad de aplicaciones médicas. Por ejemplo, el material de soporte se puede utilizar como un apósito para heridas y/o como un material de sutura, en el que el material de soporte se aplica sobre una parte de un área de la herida o tejido. El término "herida" se refiere a cualquier lesión que da lugar a un daño tisular, penetración de tejido, laceración o lesiones. Entre las heridas susceptibles de tratamiento por el material de soporte se incluyen lesiones que pueden localizarse en cualquier sitio, incluyendo interno, interfacial, externo, intersticial, extracorpóreo y/o intracorpóreo. Entre los ejemplos de heridas adecuadas para el cubrimiento con el material de soporte se incluyen cortes, tajos, heridas abiertas, 20 rotura de tejido, decúbito, dermatitis, lesiones, heridas crónicas, heridas del campo de batalla, heridas necróticas, agudas, crónicas, traumáticas, laceraciones, abrasiones, contusiones, fascitis necrosante, nercolisis epidérmica tóxica, heridas por presión, úlceras por insuficiencia venosa, úlceras arteriales, úlceras diabéticas o neuropáticas, úlceras por presión, úlceras mixtas, heridas por quemaduras, mucormicosis, heridas vasculíticas, pioderma gangrenosas, y equivalentes, y/o combinaciones de las mismas, conocidas por los expertos en la materia. Se contempla el tratamiento de heridas en sujetos humanos y animales.

25 En ciertas realizaciones, el material de soporte se utiliza para la reconstrucción de la pared abdominal, por ejemplo, para reparar hernias. Por ejemplo, en la reparación de una hernia, el cirujano hace una incisión cerca de la localización de la hernia. Para una hernia inguinal, la incisión se realiza justo por encima del pliegue donde el abdomen se encuentra con el muslo. Para reparar una hernia umbilical, se realiza cerca del ombligo. Si la hernia se ha producido en el sitio de una operación anterior, la incisión de esa cirugía se vuelve a abrir. La cirugía prosigue de la misma manera, independientemente de donde se realiza la incisión. El saco herniario se abre cuidadosamente y el intestino u otro tejido se colocan de nuevo en el interior del abdomen. El área debilitada se repara y se refuerza con una malla sintética o una sutura que tira del tejido muscular abdominal.

35 El material de soporte descrito en el presente documento se puede utilizar como un material de malla o sutura, o se utiliza para reforzar un material de malla o sutura. El material de soporte se puede utilizar para reforzar o mejorar un producto para el cuidado de una herida o curación de tejidos, tal como un apósito para heridas, un material de malla, un vendaje o una sutura. Por ejemplo, el material de soporte se puede utilizar junto con un apósito para heridas, un material de malla o una sutura o entremezclado con los mismos. Cuando se utiliza como un material de malla o de sutura, o para reforzar un material de malla o de sutura, el material de soporte puede tratarse para aumentar la reticulación de los materiales componentes de la ECM, utilizando, por ejemplo, reticulantes químicos, tales como glutaraldehído o cromo. El material de soporte también se puede utilizar para reemplazar la encía perdida debido a una enfermedad periodontal, formar un cabestrillo de vejiga y facilitar la reconstrucción del suelo pélvico.

45 Tal como se utiliza en el presente documento, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

## 50 **EJEMPLOS**

### Ejemplo 1

#### *Extracción de la piel*

55 Se extrajo la piel de un filete de pescado, junto con la máxima grasa epidérmica posible. La piel de pescado se desescamó en una tabla de cortar mediante raspado de la superficie de la piel de pescado con un cuchillo.

#### *Desinfección y estabilización*

60 La piel desescamada se lavó dos veces durante 1 hora a 4°C con solución salina estéril tamponada con fosfato que contenía ácido ascórbico 50 mM, 500 ppm de estreptomycin, respectivamente.

#### *Descelularización*

65 a) La piel de pescado se colocó en NaCl 1 M durante 8 horas, seguido de incubación en ácido desoxicólico al 2% que contenía azida sódica al 0,02% y 500 ppm de estreptomycin.

b) La solución en a) se separó por vertido. La piel de pescado se colocó en solución salina equilibrada de Hank durante 10 min a 40 rpm a temperatura ambiente. La etapa se repitió y la piel de pescado se colocó en un recipiente en una campana de flujo laminar, se abrió y la solución se separó por aspiración. El procedimiento se repitió dos veces más.

5 c) La piel de pescado se trató con una solución descelularizante que contenía SDS al 0,5% y se colocó el recipiente en un rotor a 40 rpm durante 1 hora a temperatura ambiente.

d) La solución descelularizante se extrajo, tal como se describe en b), mediante aspiración. La piel de pescado se lavó con 50 ml de solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco.

#### 10 *Digestión*

La piel de pescado se incubó durante 18 horas a temperatura ambiente en una solución de digestión que consistía en Tris-HCl 1 M, tripsina 0,05 µg/ml, a un pH de 8,5.

#### 15 *Crioprotección*

La piel de pescado se sumergió en una solución de pre congelación que contenía 7% de dextrano, 6% de sacarosa, 6% de rafinosa y EDTA 1 mM en solución salina equilibrada de Hank.

#### 20 *Lavado*

La piel de pescado se lavó con la solución de pre congelación y se colocó en un rotor a 40 rpm durante 120 min a temperatura ambiente.

#### 25 *Envasado*

La piel de pescado se insertó en una bolsa que se cerró sellando con calor. La bolsa fue una bolsa de membrana TYVEK® porosa de grado médico de DuPont, adecuada para la esterilización con óxido de etileno (EtOx).

#### 30 *Liofilización*

La bolsa que contenía la piel de pescado se insertó en un liofilizador y se liofilizó.

#### *Esterilización*

35 La bolsa que contenía la piel de pescado se insertó en una cámara de óxido de etileno y se trató con 1 a 5 ciclos de óxido de etileno para esterilizar la piel de pescado.

#### Ejemplo 2

#### 40 *Extracción de la piel*

Se extrajo la piel de un filete de pescado, junto con la máxima grasa epidérmica posible. La piel de pescado se desescamó en una tabla de cortar mediante raspado de la superficie de la piel de pescado con un cuchillo.

#### 45 *Desinfección y estabilización*

La piel desescamada se lavó dos veces durante 1 hora a 4°C con solución salina estéril tamponada con fosfato que contenía ácido ascórbico 50 mM, 500 ppm de estreptomycin, respectivamente.

#### 50 *Descelularización*

a) La piel de pescado se colocó en solución salina tamponada con fosfato que contenía 2,5 U/ml de dispasa II (o pronasa) y azida sódica al 0,02% y se incubó a 4°C durante 8 horas con agitación continua. A continuación, la solución se separó por vertido y la muestra se incubó bajo agitación suave en una segunda solución de TRITON® X-100 al 0,5% y azida sódica al 0,02% durante 24 horas.

55 b) La segunda solución en a) se separó por vertido. La piel de pescado se colocó en solución salina equilibrada de Hank durante 10 min a 40 rpm a temperatura ambiente. La etapa se repitió y la piel de pescado se colocó en un recipiente en una campana de flujo laminar, se abrió y la solución se separó por aspiración. El procedimiento se repitió dos veces más.

60 c) La piel de pescado se trató con una solución descelularizante que contenía SDS al 0,5% y el recipiente se colocó en un rotor a 40 rpm durante 1 hora a temperatura ambiente.

d) La solución descelularizante de c) se extrajo, tal como se describe en b), mediante aspiración. La piel de pescado se lavó con 50 ml de solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco.

65

*Digestión*

La piel de pescado se incubó durante 18 horas a temperatura ambiente en una solución de digestión de Tris-HCl 1 M, tripsina 0,05 µg/ml, a un pH de 8,5.

5

*Crioprotección*

La piel de pescado se sumergió en una solución de pre congelación que contenía 7% de dextrano, 6% de sacarosa, 6% de rafinosa y EDTA 1 mM en solución salina equilibrada de Hank.

10

*Lavado*

La piel de pescado se lavó con la solución de pre congelación y se colocó en un rotor a 40 rpm durante 120 min a temperatura ambiente.

15

*Envasado*

La piel de pescado se insertó en una bolsa de membrana TYVEK® y se cerró sellando con calor.

20

*Liofilización*

La bolsa que contenía la piel de pescado se insertó en un liofilizador y se liofilizó.

25

*Esterilización*

La bolsa que contenía la piel de pescado se insertó en una cámara de óxido de etileno y se trató con 1 a 5 ciclos de óxido de etileno para esterilizar la piel de pescado.

30

Ejemplo 3

*Extracción de la piel*

Se extrajo la piel de un filete de pescado, junto con la máxima grasa epidérmica posible. La piel de pescado se desescamó en una tabla de cortar mediante raspado de la superficie de la piel de pescado con un cuchillo.

35

*Congelación*

Las pieles de pescado se congelaron en un congelador rápido estándar de piscifactoría. Durante el proceso de congelación, las células se lisaron. La congelación inhibe el crecimiento microbiano.

40

*Descongelación*

Las pieles de pescado se descongelaron a 4°C.

45

*Desinfección y estabilización*

La piel descamada se lavó dos veces durante 1 hora a 4°C con solución salina tamponada con fosfato estéril que contenía ácido ascórbico 50 mM, 500 ppm de estreptomycin, respectivamente.

50

*Descelularización*

a) La piel de pescado se trató con una solución descelularizante que contenía SDS al 0,5% y el recipiente se colocó en un rotor a 40 rpm durante 1 hora a temperatura ambiente.

55

b) La solución descelularizante se extrajo mediante aspiración. La piel de pescado se lavó con 50 ml de solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco.

*Digestión*

La piel de pescado se incubó durante 18 horas a temperatura ambiente en una solución de digestión de Tris-HCl 1 M, tripsina 0,05 µg/ml, a un pH de 8,5.

60

*Crioprotección*

La piel de pescado se sumergió en una solución de pre congelación que contenía 7% de dextrano, 6% de sacarosa, 6% de rafinosa y EDTA 1 mM en solución salina equilibrada de Hank.

65

*Lavado*

La piel de pescado se lavó con la solución de pre congelación y se colocó en un rotor a 40 rpm durante 120 min a temperatura ambiente.

5

*Envasado*

La piel de pescado se insertó en una bolsa de membrana TYVEK® y se cerró sellando con calor.

10 *Liofilización*

La bolsa que contenía la piel de pescado se insertó en un liofilizador y se liofilizó.

*Esterilización*

15 La bolsa que contenía la piel de pescado se insertó en una cámara de óxido de etileno y se trató con 1 a 5 ciclos de óxido de etileno para esterilizar la piel de pescado.

Ejemplo 4

20 Se procesaron pieles de pescado tal como se describe en cada uno de los ejemplos 1-3, excepto que también se añadió un agente de blanqueo (sulfito de sodio) a la solución de pre congelación a una concentración del 0,5% en la etapa de lavado para obtener una matriz de soporte blanqueada.

25 Ejemplo 5

Las mezclas de blanqueo/descelularización se prepararon de la siguiente manera:

<b>Mezcla de blanqueo A</b>	
Estearato de glicerilo	5%
Persulfato de amonio	20%
EDTA	0,5%
Goma xantana	3,5%
Persulfato de amonio	46%
Sílice	2%
Sílice hidratada	2%
SDS	2%
Percarbonato de magnesio	19%

<b>Mezcla de blanqueo B</b>	
Persulfato de potasio	56%
Persulfato de sodio	3%
Sílice	2,7%
SDS	1%
Sílice hidratada	1%
EDTA	1%
Metasilicato de sodio	35,3%

<b>Mezcla de blanqueo C</b>	
Persulfato de amonio	5%
Persulfato de potasio	40%
Persulfato de sodio	10%
Goma guar	3%
Sílice hidratada	7%
Sílice	3%
Estearato de glicerilo	2%
EDTA	0,5%
SDS	1%
Percarbonato de magnesio	15%
Metasilicato de sodio	13,5%

30

<b>Mezcla de blanqueo D</b>	
Persulfato de amonio	10%
Persulfato de potasio	40%
Persulfato de sodio	10%
Hidroxietil celulosa	3%
Sílice hidratada	7%
Sílice	3%
Estearato de glicerilo	1%
EDTA	0,25%
SDS	0,5%
Percarbonato de magnesio	15%
Metasilicato de sodio	10,25%

<b>Mezcla de blanqueo E</b>	
Persulfato de amonio	15%
Persulfato de potasio	35%
Persulfato de sodio	10%
Hidroxietil celulosa	3%
Sílice hidratada	7%
Sílice	3%
Estearato de glicerilo	1%
EDTA	0,25%
SDS	0,5%
Percarbonato de magnesio	10,25%
Metasilicato de sodio	15%

Nota: los porcentajes son en peso de la mezcla de blanqueo total (seca)

### Ejemplo 6

5

#### *Extracción de la piel*

Se extrajo la piel de un filete de pescado. La piel de pescado se desescamó sustancialmente mediante raspado de la superficie de la piel de pescado con un cepillo de alambre de acero y un cuchillo.

10

#### *Congelación*

La piel se congeló en un congelador rápido (es decir, colocado directamente en un congelador a -80°C). A continuación, la piel se sacó del congelador y se descongeló a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas.

15

#### *Descelularización*

a) El tejido se incubó en una solución de TRITON® X-100 al 0,5% y azida sódica al 0,02% en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS), se agitó a 40 rpm durante 2 horas a temperatura ambiente y la solución se separó por vertido.

20

b) El proceso de descamado se continuó con un cuchillo. El resultado fue un producto libre de escamas (no había escamas visibles).

c) El tejido se colocó, a continuación, en L-glutamina 2 mM en solución salina equilibrada de Hank (HBSS) durante 10 min a 40 rpm y a temperatura ambiente, y la solución se separó por vertido.

25

d) El tejido se colocó en una solución de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0,5% en HBSS durante 1 hora a temperatura ambiente, se agitó a 40 rpm y la solución se separó por vertido.

#### *Digestión*

30

El tejido se incubó durante 18 horas a temperatura ambiente en una solución de digestión de EDTA 1 M, tripsina 0,05 µg/ml, a un pH de 8,5.

#### *Blanqueo*

35

El tejido se blanqueó con mezcla de blanqueo C y peróxido de hidrógeno al 2% durante 30 minutos.

*Lavado*

El tejido se lavó en un flujo continuo de agua durante 48 horas a 6°C.

5 *Crioprotección*

La piel de pescado se sumergió en una solución de precongelación que contenía 7% de dextrano, 6% de sacarosa, 6% de rafinosa y EDTA 1 mM en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS).

10 *Envasado*

La piel de pescado se insertó en una bolsa de membrana TYVEK® y se cerró sellando con calor.

*Liofilización*

15 La bolsa que contenía la piel de pescado se insertó en un liofilizador y se liofilizó.

*Esterilización*

20 La bolsa que contenía la piel de pescado se insertó en una cámara de óxido de etileno y se trató con 1 a 5 ciclos de óxido de etileno para esterilizar el soporte.

Ejemplo 7

25 El producto se produjo como en el ejemplo 6, aparte de la etapa de congelación después de la extracción de la piel. En lugar de la etapa de congelación, el tejido se lavó dos veces durante 1 hora a 4°C con solución salina estéril tamponada con fosfato que contenía ácido ascórbico 50 mM, 500 ppm de estreptomicina, respectivamente.

Ejemplo 8

30 *Extracción de la piel*

Se extrajo la piel de un filete de pescado. La piel de pescado se desescamó mediante raspado de la superficie de la piel de pescado con un cepillo de alambre de acero y un cuchillo.

35 *Congelación*

La piel se congeló en un congelador rápido a -80°C. A continuación, la piel se sacó del congelador y se descongeló a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas.

40 *Descelularización*

45 a) El tejido se incubó en una solución de TRITON® X-100 al 0,5% y EDTA al 0,02% en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS), se agitó a 40 rpm durante 24 horas a temperatura ambiente y la solución se separó por vertido.

b) El proceso de descamado se continuó con un cuchillo. El resultado fue un producto libre de escamas (no había escamas visibles).

c) El tejido se colocó en una solución de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0,5% en HBSS durante 1 hora a temperatura ambiente, se agitó a 40 rpm y la solución se separó por vertido.

50 d) El tejido se colocó, a continuación, en L-glutamina 2 mM en solución salina equilibrada de Hank (HBSS) durante 10 min a 40 rpm y a temperatura ambiente, y la solución se separó por vertido.

*Blanqueo*

55 El tejido se blanqueó con mezcla de blanqueo C y peróxido de hidrógeno al 2% durante 30 minutos.

*Lavado*

El tejido se lavó en un flujo continuo de agua durante 48 horas a 6°C.

60 *Crioprotección*

La piel de pescado se sumergió en una solución de precongelación que contenía 7% de dextrano, 6% de sacarosa, 6% de rafinosa y EDTA 1 mM en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS).

65

*Envasado*

La piel de pescado se insertó en una bolsa de membrana TYVEK® y se cerró sellando con calor.

5 *Liofilización*

La bolsa que contenía la piel de pescado se insertó en un liofilizador y se liofilizó.

*Esterilización*

10 La bolsa que contenía la piel de pescado se insertó en una cámara de óxido de etileno y se trató con 1 a 5 ciclos de óxido de etileno para esterilizar el soporte.

Ejemplo 9

15 El producto se produjo como en el ejemplo 8, aparte de la etapa de congelación después de la extracción de la piel. En lugar de la etapa de congelación, el tejido se lavó dos veces durante 1 hora a 4°C con solución salina estéril tamponada con fosfato que contenía ácido ascórbico 50 mM, 500 ppm de estreptomycin, respectivamente.

20 Ejemplo 10

*Extracción de la piel*

25 Se extrajo la piel de un filete de pescado. La piel de pescado se desescamó mediante raspado de la superficie de la piel de pescado con un cepillo de alambre de acero y un cuchillo.

*Congelación*

30 La piel se congeló en un congelador rápido a -80°C. A continuación, la piel se sacó del congelador y se descongeló a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas.

*Descelularización*

35 a) El tejido se incubó en una solución de TRITON® X-100 al 0,5% y EDTA al 0,02% en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS), se agitó a 40 rpm durante 48 horas a temperatura ambiente y la solución se separó por vertido.  
b) El tejido se colocó, a continuación, en L-glutamina 2 mM en solución salina equilibrada de Hank (HBSS) durante 10 min a 40 rpm y a temperatura ambiente, y la solución se separó por vertido.

40 *Blanqueo*

El tejido se blanqueó con mezcla de blanqueo C Kerecis y peróxido de hidrógeno al 2% durante 30 minutos.

*Lavado*

45 El tejido se lavó en un flujo continuo de agua durante 12 horas a 6°C.

*Crioprotección*

50 La piel de pescado se sumergió en una solución de pre congelación que contenía 7% de dextrano, 6% de sacarosa, 6% de rafinosa y EDTA 1 mM en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS).

*Envasado*

55 La piel de pescado se insertó en una bolsa de membrana TYVEK® y se cerró sellando con calor.

*Liofilización*

60 La bolsa que contenía la piel de pescado se insertó en un liofilizador y se liofilizó.

*Esterilización*

65 La bolsa que contenía la piel de pescado se insertó en una cámara de óxido de etileno y se trató con 1 a 5 ciclos de óxido de etileno para esterilizar el soporte.

Ejemplo 11

El producto se produjo como en el ejemplo 10, aparte de la etapa de congelación después de la extracción de la piel. En lugar de la etapa de congelación, el tejido se lavó dos veces durante 1 hora a 4°C con solución salina estéril tamponada con fosfato que contenía ácido ascórbico 50 mM, 500 ppm de estreptomicina, respectivamente.

Ejemplo 12

*Extracción de la piel*

Se extrajo la piel de un filete de pescado. La piel de pescado se desescamó mediante raspado de la superficie de la piel de pescado con un cepillo de alambre de acero y un cuchillo. El resultado fue un producto sin escamas.

*Congelación*

La piel se congeló en un congelador rápido a -80°C. A continuación, la piel se sacó del congelador y se descongeló a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas.

*Descelularización y blanqueo*

- a) El tejido se incubó con una mezcla de blanqueo C y peróxido de hidrógeno al 2% durante 30 minutos.
- b) El tejido se colocó en una solución de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0,5% en HBSS durante 1 hora a temperatura ambiente, se agitó a 40 rpm y la solución se separó por vertido.
- d) El tejido se colocó, a continuación, en L-glutamina 2 mM en solución salina equilibrada de Hank (HBSS) durante 10 min a 40 rpm y a temperatura ambiente, y la solución se separó por vertido.

*Lavado*

El tejido se lavó en un flujo continuo de agua durante 12 horas a 6°C.

*Crioprotección*

La piel de pescado se sumergió en una solución de pre congelación que contenía 7% de dextrano, 6% de sacarosa, 6% de rafinosa y EDTA 1 mM en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS).

*Envasado*

La piel de pescado se insertó en una bolsa de membrana TYVEK® y se cerró sellando con calor.

*Liofilización*

La bolsa que contenía la piel de pescado se insertó en un liofilizador y se liofilizó.

*Esterilización*

La bolsa que contenía la piel de pescado se insertó en una cámara de óxido de etileno y se trató con 1 a 5 ciclos de óxido de etileno para esterilizar el soporte.

Ejemplo 13

El producto se produjo como en el ejemplo 12, aparte de la etapa de congelación después de la extracción de la piel. En lugar de la etapa de congelación, el tejido se lavó dos veces durante 1 hora a 4°C con solución salina estéril tamponada con fosfato que contenía ácido ascórbico 50 mM, 500 ppm de estreptomicina, respectivamente.

Ejemplo 14

Se midió el grosor del producto antes y después de la liofilización. El grosor se midió con un calibrador digital. El grosor promedio antes y después de la liofilización fue de 0,29 mm y 0,46 mm, respectivamente. El producto se puede rehidratar (por ejemplo, en una solución de agua salada) después de la liofilización y antes de su utilización sobre una herida. Cuando se ensayó el producto liofilizado y rehidratado, el grosor promedio fue de 0,30 mm. La pérdida de agua (basada en la diferencia de peso antes y después de la liofilización) se calculó que era de aproximadamente el 80-82%.

Ejemplo 15

La permeabilidad del producto se midió a presión atmosférica y al vacío (0,2 atm.) La permeabilidad promedio a

presión atmosférica fue de 3,73 mg de agua por mm cuadrado de muestra durante 24 horas. La permeabilidad promedio al vacío fue de 4,93 mg de agua por mm cuadrado de muestra durante 180 s.

Ejemplo 16

5 Se realizaron ensayos de biodegradabilidad preliminares mediante la incubación de las muestras del producto en agua salina isotónica o bien en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco) a 32°C. Después de aproximadamente 6-10 días, las muestras se degradaron en más del 50% (en peso).

10 Ejemplo 17

Se realizaron pruebas de citotoxicidad preliminares mediante la incubación de muestras del producto con células fibroblásticas de prepucio humano (línea celular Hs27, ATCC CRL-1634) en DMEM, glucosa y suero bovino fetal al 10%. Las muestras no causaron ningún cambio fenotípico observable, disminución o muerte celular.

15 Ejemplo 18

20 Se ensayó el producto para determinar el límite elástico, la resistencia a la tracción y el alargamiento. Se rehidrataron muestras uniformes que medían 33 mm por 6 mm y se aseguraron en agarres a 0,4 bar de presión en una celda de carga de 500 N. Las muestras se mantuvieron húmedas durante la duración del ensayo. Los resultados se muestran en la tabla 1 a continuación:

Tabla 1

Número de muestra	Grosor de la muestra [mm]	Fuerza máxima [N]	Alargamiento a la máxima tensión [mm]	Tensión máxima [%]	Tensión a la fuerza máxima [Mpa]
1	0,48	18,10	11,68	35,4%	6,5
2	0,63	34,52	10,67	32,3%	9,2
3	0,35	26,66	13,53	41,0%	12,0
4	0,45	8,70	11,32	34,3%	3,1
5	0,56	75,59	20,52	62,2%	22,7
6	0,76	86,00	21,85	66,2%	19,0
7	0,76	64,80	27,32	82,8%	14,3
8	0,77	69,75	18,71	57,0%	15,0
9	0,33	23,67	11,66	35,3%	11,74
10	0,29	6,91	17,02	51,6%	4,51

Nota: 1 Mpa (megapascal) = 1 N/mm<sup>2</sup>

25 El material de soporte descrito en el presente documento es más fuerte y se alarga considerablemente más que los injertos de matriz acelular fabricados a partir de vejigas urinarias de ratas, cerdos y seres humanos (véase Dahms y otros, Composition and biomechanical properties of the bladder acellular matrix graft: comparative analysis in rat, pig and human. British Journal of Urology 1998; 82 (3): 411-419) y ALLODERM<sup>®</sup> aprobado por la FDA (véase Bottino y otros, Freeze-dried acellular dermal matrix graft: Effects of rehydration on physical, chemical, and mechanical properties. Dental Materials. 2009; 25 (9): 1109-1115).

30 Se hicieron intentos de ensayos de la resistencia a la tracción de OASIS<sup>®</sup> (submucosa de intestino delgado porcino) y MATRISTEM<sup>®</sup> (vejiga urinaria porcina), pero las muestras de ambos productos se disgregaron antes de realizar cualquier medición.

35

**REIVINDICACIONES**

1. Material de soporte que comprende:  
5 piel de pescado sustancialmente sin escamas, descelularizada, y liofilizada o prensada al vacío en una forma seca que tiene una estructura intersticial tridimensional de componentes de matriz extracelular biológicos naturales derivados de la piel de pescado, incluyendo la estructura intersticial tridimensional hasta aproximadamente el 25% (peso/peso) de lípidos de origen natural de la piel de pescado.
- 10 2. Material de soporte, según la reivindicación 1, en el que el material de soporte está en forma de un apósito para heridas, vendaje, material de sutura y/o material de malla.
3. Material de soporte, según la reivindicación 1 o 2, en el que el material de soporte es biocompatible.
- 15 4. Material de soporte, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el material de soporte comprende, además, uno o más agentes activos añadidos.
- 20 5. Material de soporte, según la reivindicación 4, en el que el agente activo añadido se selecciona del grupo que comprende antibióticos, antisépticos, agentes antimicrobianos, antivirales, antifúngicos, antiparasitarios, agentes antiinflamatorios, antioxidantes, fármacos, proteínas, péptidos y combinaciones de los mismos.
- 25 6. Procedimiento para producir un material de soporte, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, comprendiendo el procedimiento:  
(a) obtener una piel de pescado;  
(b) extraer sustancialmente cualquier escama del pescado presente en la piel del pescado; y  
(c) descelularizar y liofilizar o prensar al vacío la piel de pescado.
- 30 7. Procedimiento, según la reivindicación 6, que incluye, además, las etapas de lavar, blanquear, digerir y/o críoconservar la piel de pescado.
8. Procedimiento, según la reivindicación 6 o 7, en el que descelularizar comprende uno o más tratamientos físicos, uno o más tratamientos químicos, uno o más tratamientos enzimáticos, o cualquier combinación de los mismos.
- 35 9. Procedimiento, según la reivindicación 8, en el que el tratamiento químico comprende el tratamiento de la piel de pescado con uno o más agentes descelularizantes seleccionados del grupo que comprende sales iónicas, bases, ácidos, detergentes, agentes oxidantes, soluciones hipertónicas, agentes quelantes, disolventes orgánicos, metionina, cisteína, ácido maleico, polímeros que se unen a ADN, y combinaciones de los mismos.
- 40 10. Procedimiento, según la reivindicación 8, en el que el tratamiento enzimático comprende tratar la piel de pescado con una o más enzimas seleccionadas del grupo que comprende proteasas, endonucleasas y exonucleasas.
11. Material de soporte producido usando el procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10.
- 45 12. Material de soporte, según la reivindicación 11, en el que el material de soporte está en forma de un vendaje, material de malla y/o material de sutura y se utiliza para reemplazar encía perdida debido a una enfermedad periodontal, para formar un cabestrillo de vejiga, o para facilitar la reconstrucción de la pared abdominal y/o el suelo pélvico.

Figura 1.

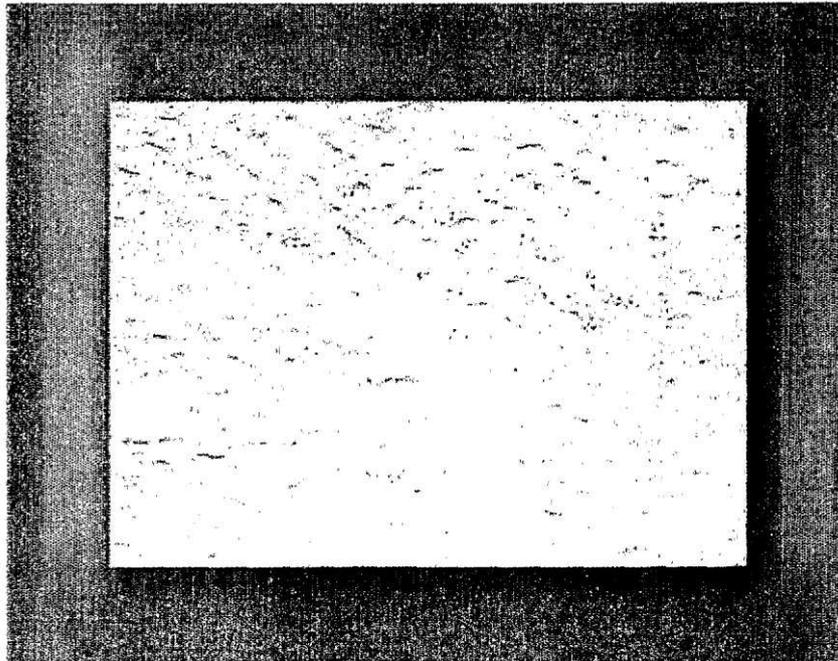
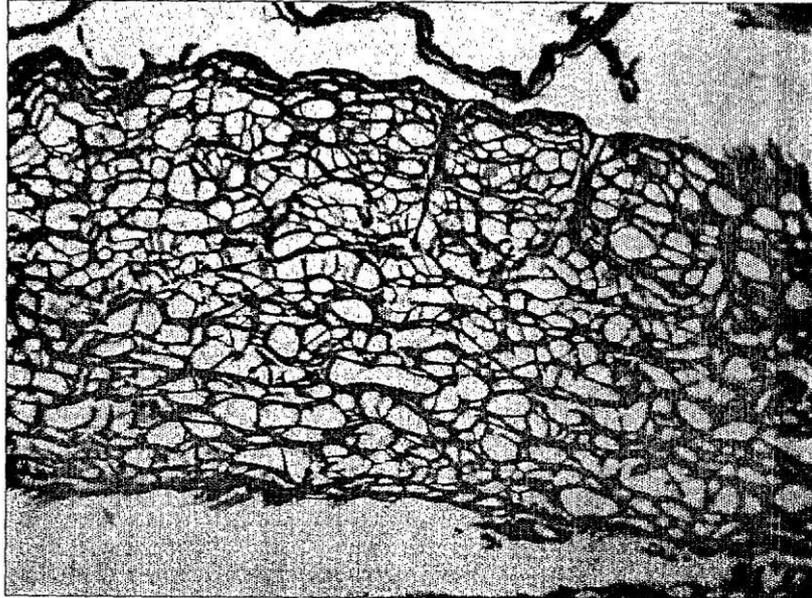


Figura 2.

A.



B.

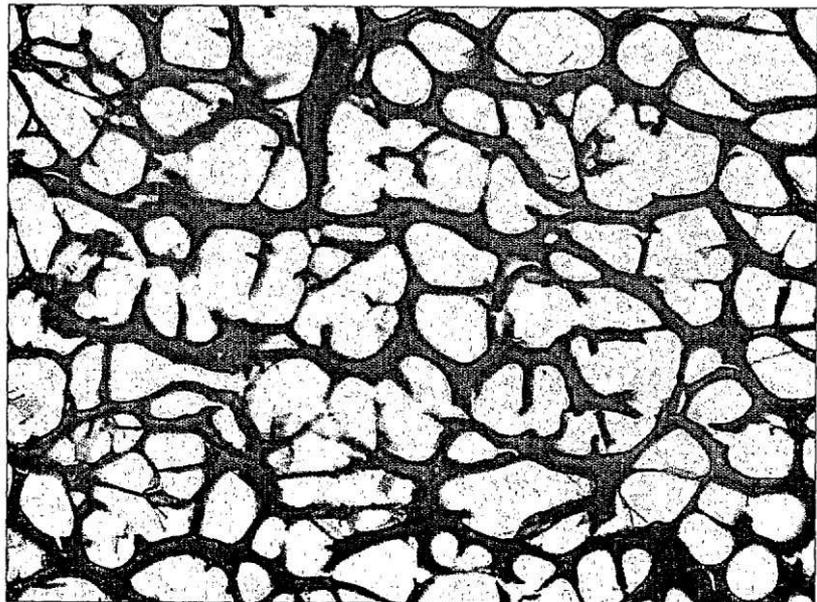
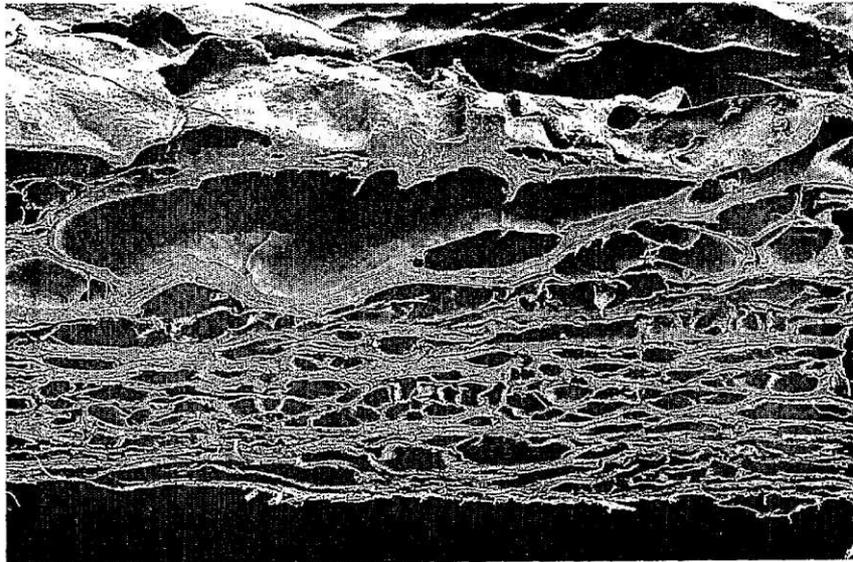


Figura 3.

A.



B.

